



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA COM EXTRATO DE CASCAS DE CASTANEA SATIVA BASEADO NO CONCEITO “QUALITY BY DESIGN”

Nágilla Silva de Oliveira

M

2020



Nágilla Silva de Oliveira

**Desenvolvimento e otimização de uma formulação
tópica com extrato de cascas de *Castanea sativa*
baseado no conceito “*Quality by design*”**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho desenvolvido sob a orientação de:

Professor Doutor Paulo Jorge Cardoso da Costa

Professora Doutora Francisca Lisboa Rodrigues

Outubro 2020

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Este trabalho foi financiado e desenvolvido no âmbito do projeto com a referência PTDC/ASP-AGR/29277/2017 - Cascas de *Castanea sativa* como fonte de ingredientes ativos para alimentos funcionais e cosméticos: uma abordagem sustentável, financiado por Fundos Nacionais através da FCT/MCTES e Fundos FEDER através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização - COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-029277).

Este trabalho foi também suportado pela Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (UID/Multi/04378/2019).

Agradecimentos

Na presente dissertação de mestrado, pude contar com o apoio direto e indireto de várias pessoas as quais estou imensamente grata e gostaria de deixar registrado meu agradecimento.

Ao meu orientador Professor Doutor Paulo Costa, agradeço por toda orientação prestada, paciência, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou não só na presente dissertação, mas em todo curso de mestrado. Obrigada por toda transferência de conhecimento e sentido prático com que sempre me orientou.

À minha coorientadora Professora Doutora Francisca Rodrigues, agradeço por todo apoio, paciência, empenho e por toda disponibilidade que apresentou para me ajudar.

Aos professores, funcionários e colegas da FFUP que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais e ao meu marido pelo apoio incondicional nas minhas escolhas, por todo incentivo, paciência, motivação e por toda compreensão.

Resumo

Atualmente, a indústria cosmética tem grande interesse em utilizar extratos naturais em seus produtos, em especial, os produtos de origem vegetal. Ao longo dos anos, vem se discutido as propriedades antioxidantes dos extratos de casca de *Castanea sativa* Mill, tendo-se observado a presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e taninos (condensados e hidrolisáveis), que atuam na prevenção do envelhecimento cutâneo, além de apresentar atividade anti-inflamatória, promover hidratação da pele e uma proteção do colagénio. Os produtos semissólidos tópicos são um dos mercados de produtos de maior crescimento e suas exigências de mercado mudam constantemente. Garantir a qualidade, segurança e eficácia de um produto é um desafio constante a ser enfrentado, exigindo projetos bem estruturados e uma melhor compreensão do mesmo. O conceito “*Quality by design*” (QbD), em português, “Qualidade por concepção”, simboliza um avanço para as indústrias quanto para as entidades reguladoras, no qual se baseia em uma abordagem sistemática que permite que a qualidade dos produtos seja estabelecida através do planejamento baseado em dados comprovados, conhecimentos estabelecidos e gestão do risco. O QbD é um conceito que também favorece a indústria cosmética e apesar da regulamentação neste setor ser menos rigorosas, a qualidade e a segurança são cada vez mais importantes para os produtos produzidos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar uma formulação tópica semissólida com extrato de cascas de *Castanea sativa* Mill. seguindo o conceito “*Quality by design*”. Tendo como foco realizar um desenvolvimento mais planejado, levando em consideração as vulnerabilidades de todo processo através de ferramentas de análise de risco e desenho de experiências (DoE). Um plano Box-Behnken foi utilizado como ferramenta estatística para a execução do desenho de experiências e para análise das respostas metodologia da superfície de resposta. Após esta resposta foi possível desenvolver a formulação otimizada, no qual foram armazenadas à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) e caracterizadas ao longo do tempo, no que se refere as características organolépticas e tecnológicas, o que permitiu observar resultados satisfatórios para tal formulação, bem como prever que a formulação é estável. Este estudo demonstrou a eficiência da metodologia QbD no entendimento da variabilidade do produto, demonstrando que tal abordagem favorece a uma melhor compreensão de todo o processo, maior flexibilidade, uma etapa de desenvolvimento mais robusta, com menor custo e produtos de alta qualidade.

Palavras-chave: cascas de *Castanea sativa* Mill; Quality by design; Desenho de experiências; espaço de concepção; Cosmético.

Abstract

Currently, the cosmetic industry has great interest in using natural extracts in your products, in particular, products of vegetable origin. Over the years, the antioxidant properties of chestnut bark extracts have been discussed, having observed the presence of phenolic compounds, especially phenolic acids and tannins (condensed and hydrolysable), that act in the prevention of skin aging, besides presenting anti-inflammatory activity, promoting hydration of the skin and a protection of the collagen. Topical semisolid products are one of the fastest growing product markets and their market requirements are constantly changing. To ensure the quality, safety and efficacy of a product is a constant challenge to be faced, requiring well-structured projects and a better understanding of it. The concept “Quality by design” (QbD), in Portuguese “Qualidade baseada no projeto”, symbolizes an advance for the industries and for regulatory bodies, in which is based in a systematic approach that allows the quality of products be established through “design” based in confirmed data, prior knowledge and quality risk management. The QbD is a concept that also favors the cosmetic industry and despite the regulations in this sector are less stringent, quality and safety are increasingly important for the products produced. The objective of this study to develop and optimize a semisolid topical formulation with *Castanea sativa* Mill. bark extract according the concept “Quality by design”. Having as focus make a more planned development, taking into account the vulnerabilities of the entire process through risk analysis tools and design of experiments (DoE). A Box-Behnken design it was used as a statistical tool for the execution of the experiment design and for the analysis of the response surface methodology responses. After this answer it was possible develop the optimized formulation, in which they were stored at room temperature (25 ± 1 °C) and characterized over time, with regard to organoleptic and technological characteristics, which allowed observing satisfactory results for such formulation, as well as predicting that the formulation is stable. Such tools were essential to get the design space. This study demonstrated the efficiency of the QbD methodology in understanding product variability, demonstrating that such an approach favors of a better understanding of the whole process, greater flexibility, enables to design a more robust development stage, reduced costs and high-quality products.

Key words: *Castanea sativa* Mill shells; Quality by design; Design of Experiments; Design space; Cosmectis.

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Castanea sativa Mill.	1
1.1.1	Atividade antioxidante	3
1.2	Quality by Design	10
1.2.1	Conceito <i>quality by design</i>	10
1.2.2	Elementos da QbD	11
2	OBJETIVOS	23
3	PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1	Materiais e equipamentos	24
3.1.1	Matérias-primas	25
3.2	Métodos	26
3.2.1	Determinação QTPP e CQAs	26
3.2.2	Metodologia para a avaliação do risco	27
3.2.3	Desenho de experiências (DoE)	28
3.2.4	Método de preparação dos cremes hidrófilos	30
3.2.5	Métodos de caracterização das formulações	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Fase I- Fase preliminar do quality by design	50
4.1.1	Determinação do QTPP, CQAs, CMAs, CPPs e análise de risco	50
4.1.2	Estudo de viabilidade	56
4.2	Fase II- DoE	64
4.2.1	Análise organolética	64
4.2.2	Avaliação do pH	66
4.2.3	Análise da textura	67
4.2.4	Diâmetro da fase interna dos cremes	69
4.2.5	Colorimetria	70
4.2.6	Viscosidade	70
4.2.7	Desenho experimental com plano Box–Behnken	71
4.3	Estudo de estabilidade da formulação otimizada	80
4.3.1	Análise organolética	81
4.3.2	Análise do pH ao longo do tempo	81
4.3.3	Análise da textura ao longo do tempo	82

4.3.4	Análise do diâmetro da fase interna ao longo do tempo	83
4.3.5	Análise colorimétrica ao longo do tempo	84
4.3.6	Ensaio reológicos	85
5	Conclusões	88
6	Referências bibliográficas	89

Lista de Figuras

Figura 1 - Mapa ilustrador da distribuição da castanha doce na Europa. A área marcada a verde, demonstra uma provável faixa de vegetação nativa e a cor laranja ilustra as áreas onde foi introduzida e cultivada desde a era neolítica. Adaptado de (3).	1
Figura 2 - Ilustração do fruto (ouriço) e dos diferentes subprodutos do castanheiro (folha, cascas e flores) (3,4,22,23).	2
Figura 3 - Principais classes dos compostos encontrados nos subprodutos do castanheiro (40,42).....	6
Figura 4 - Estrutura química geral dos flavonoides. Adaptado de (42).....	7
Figura 5 - Estrutura química do composto fenólico do tipo não-flavonoides do grupo estilbenos. Adaptado de (50).....	8
Figura 6 - Moléculas de compostos fenólicos do tipo não-flavonoides, derivados de ácido fenólico (a) Molécula do ácido hidrocínâmico e (b) Molécula do ácido hidroxibenzoico. Adaptado de (54).	9
Figura 7- Ilustração da relação entre os materiais de entrada (CMAs e CPPs) e materiais de saída (CQAs) de uma operação unitária no processo de fabrico. Adaptado de (63)...	13
Figura 8 – Aplicações da gestão do risco de qualidade durante o ciclo de vida de um produto segundo a Guideline ICH Q9.....	14
Figura 9 - Ilustração em representação espacial 3D de matrizes (a) plano fatorial completo de três níveis, (b) plano composto central e (c) plano Box – Behnken para três variáveis. Imagem retirada de (72).	18
Figura 10 - Ilustração em representação espacial 3D (a) o cubo para Box-Behnken e (b) três plano fatoriais 22. Imagem retirada de (79).	19
Figura 11 - Representação gráfica do design space (região branca) obtido a partir da sobreposição dos intervalos de respostas de saída em função dos fatores de entrada (Parâmetros 1 e 2). Fonte: Imagens retiradas e adaptadas da Guidance ICH Q8 (R2) (61).	21
Figura 12 - Representação do Design Space; adaptado de (84). Legenda: Espaço operacional - Todos os possíveis valores que pode tomar uma variável; Espaço de conhecimento - Conhecimento sólido e robusto do comportamento de uma variável dentro dos seus limites de qualidade; Conhecimento preexistente - Literatura, experiência, empirismo, informação do fornecedor, etc.....	22
Figura 13 – a) Aquecimento da formulação em banho termostatado, b) Agitação da formulação com agitador em hélice e placa de aquecimento e c) Arrefecimento com agitação.	30
Figura 14 - Medidor de pH, pHmetro Basic 20 pH.	33

Figura 15 - Reômetro rotacional Malvern Kinexus, lab+.	35
Figura 16 - a) Adição da amostra sobre o prato inferior, b) Compressão da amostra pelo prato superior e c) Retirada do excesso de amostra que extravasou.	36
Figura 17 - Condições do teste e a resposta esperada para fluidos tixotrópicos e não tixotrópicos Adaptado de (95).	38
Figura 18 - Resposta de materiais com ou sem tensão de cedência Adaptado de (95)...	39
Figura 19 - Relações entre as ondas sinusoidal de tensão e deformação e diferentes valores de ângulo de fase em função do tipo de material (elástico (sólido ideal), viscoso (líquido ideal) e viscoelástico). Imagem adaptada de (95).	40
Figura 20 – Região de viscoelasticidade linear em função da tensão de corte. Imagem adaptada de (95).	41
Figura 21 - Resposta típica do ensaio de varrimento de frequência para materiais do tipo viscoelástico sólido (sólido aparente) e viscoelástico líquido (líquido aparente). Imagem adaptada de (95).	42
Figura 22 - Representação gráfica da força versus tempo.	44
Figura 23 – Ensaio de espalhabilidade através do Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i.	44
Figura 24 - Difratômetro laser Mastersizer 3000, com unidade de dispersão de amostras em meio líquido com volume flexível Hydro EV.	46
Figura 25 - Colorímetro Minolta modelo CR 400 (esquerda) e programa SpectraMagic NX (direita).	48
Figura 26 - Representação do espaço de cor $L^*a^*b^*$.	48
Figura 27 - Diagrama de Ishikawa resumindo as relações de causa e efeito das variáveis que afetam os CQAs no desenvolvimento do produto tópico com extrato de cascas de C. sativa.	53
Figura 28 - Gráfico de Pareto para a triagem dos CQAS.	55
Figura 29 - Gráfico de Pareto para a triagem dos parâmetros críticos do processo.	56
Figura 30 - Gráfico de avaliação do pH na fase de preliminar.	57
Figura 31 - Resultado da firmeza nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.	58
Figura 32 - Resultado de compressibilidade nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.	59
Figura 33- Resultado de adesividade nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.	59
Figura 34- Resultados do diâmetro da fase interna nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.	60

Figura 35- Gráfico da análise do grau de tixotropia do creme F1 na etapa preliminar do estudo.	61
Figura 36- Determinação do LVER.....	62
Figura 37- Gráfico da viscosidade versus tempo na fase preliminar ao longo do tempo..	62
Figura 38- Resultado do ensaio de efeito de temperatura realizado na fase preliminar do estudo.	63
Figura 39-- Gráfico dos resultados da firmeza das formulações.	68
Figura 40- Gráfico dos resultados da compressibilidade das formulações.	68
Figura 41- Gráfico dos resultados da adesividade das formulações.....	68
Figura 42 - Resultados do diâmetro da fase interna dos cremes na fase DoE.....	69
Figura 43- Gráfico da viscosidade versus frequência das formulações.	71
Figura 44– Representação de gráfico de Pareto dos efeitos principais para a resposta Y1.	75
Figura 45- Efeitos dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta Y1.....	75
Figura 46- Análise de superfície de resposta Y1 em relação aos fatores de entrada X1, X2 e X3.	76
Figura 47- Representação de gráfico de Pareto dos efeitos principais para a resposta Y2.	76
Figura 48 - Efeitos principais dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta. Y2.	77
Figura 49- Análise de superfície de resposta para Y2 em relação aos fatores de entrada X1, X2 e X3.	78
Figura 50- Representação de gráfico de Pareto dos efeitos principais para a resposta Y3.	78
Figura 51 - Efeitos principais dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta Y3.	79
Figura 52- Análise de superfície de resposta para Y3 em relação aos fatores de entrada X1, X2 e X3.	79
Figura 53- Gráfico de superfície de resposta da combinação de fatores que atinge a desejabilidade.	80
Figura 54- Análise do pH da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.	82
Figura 55- Resultado da firmeza da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.	82
Figura 56- Resultado da compressibilidade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.....	83

Figura 57- Resultado da adesividade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.....	83
Figura 58- Resultados do diâmetro da fase interna da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.....	84
Figura 59- Luminosidade (L^*) ao longo do tempo.....	84
Figura 60- Coordenadas cromáticas (a^* e b^*) ao longo do tempo.	85
Figura 61- Resultados da viscosidade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.....	86
Figura 62- Gráfico da análise do grau de tixotropia da formulação otimizada com extrato.....	87

Lista de tabelas

Tabela I - Estrutura química de alguns flavonoides. Adaptado de (41).	7
Tabela II - Planos experimentais estatísticos mais conhecidos, com resumo de suas características (72).	17
Tabela III - Matérias-primas utilizadas na preparação do creme hidrófilo.	24
Tabela IV - Equipamentos utilizados na preparação do creme hidrófilo.	24
Tabela V- Matérias-primas e as propriedades de cada uma.	26
Tabela VI - Variáveis usadas no plano Box-Behnken.	29
Tabela VII - Matriz de planeamento das experiências obtidos no plano Box–Behnken. ..	29
Tabela VIII - Fórmula base do creme hidrófilo.	31
Tabela IX – Parâmetros do processo	31
Tabela X – Formulação do creme com extrato de casca de C.sativa	32
Tabela XI - Condições do ensaio de grau de tixotropia.	38
Tabela XII - Condições do ensaio de determinação da tensão de cedência.	39
Tabela XIII - Condições do ensaio de determinação do limite da região viscoelástica linear.	41
Tabela XIV - Condições do ensaio de varrimento de frequência.	42
Tabela XV - Condições do ensaio de efeito da temperatura.	43
Tabela XVI - Condições do ensaio de análise da textura.	45
Tabela XVII - Condições do ensaio de análise do tamanho de partículas.	47
Tabela XVIII - Determinação do QTPP e do CQA do creme com extrato de cascas de C. sativa.	51
Tabela XIX - Análise inicial de risco da formulação individual do produto e dos parâmetros de processo: Baixo = parâmetro de baixo risco; Médio= parâmetro de risco médio; Alto= parâmetro de alto risco.	54
Tabela XX - Descrição das características organoléticas das preparações da formulação base na fase preliminar.	57
Tabela XXI - Descrição da variação da cor dos cremes F1, F2 e F3 na fase preliminar do estudo.	60
Tabela XXII - Descrição das características organoléticas das preparações na fase de desenho experimental.	65
Tabela XXIII - Descrição do pH das preparações da fase de DoE.	67
Tabela XXIV - Diâmetro das gotículas das preparações da fase de DoE.	70
Tabela XXV – Resultado da matriz de planeamento das experiências respostas observadas no plano Box–Behnken.	72

Tabela XXVI - Resumo do modelo e análise de variância (ANOVA) das variáveis dependentes.	74
Tabela XXVII - Comparação de valores experimentais e observados preparados em condições ótimas.	80
Tabela XXVIII - Descrição das características organoléticas das preparações.....	81

Lista de equações

Equação 1.....	16
Equação 2.....	19
Equação 3.....	20
Equação 4.....	20
Equação 5.....	34
Equação 6.....	40
Equação 7.....	73
Equação 8.....	73
Equação 9.....	73

Lista de abreviaturas

a*	Coordenada cromática vermelho/verde (no espaço de cor L*a*b*)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
b*	Coordenada cromática amarelo/azul (no espaço de cor L*a*b*)
CIR	Cosmetic ingredient review
CMA	Critical material attributes
CO ₂ H	Grupo funcional carboxilo
CPP	Critical Process Parameters
CQAs	Critical Quality Attributes
DCC	Desenho composto central
DoE	Design of Experiments
DS	Design Space
Dv	Diâmetro de volume
ERN	Espécie reativas de azoto
ERO	Espécie reativas de oxigénio
ERS	Espécie reativas de enxofre
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HOCl	Ácido hipocloroso
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ISO	Organização Internacional para Padronização
L*	Luminosidade (no espaço de cor L*a*b*)
LVER	Região viscoelástica linear
NO	Óxido nítrico
O/A	Óleo/água
O ₂ [•]	Radical superóxido
OCH ₃	Grupo funcional metoxilo

OH [•]	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pH	Potencial hidrogeniónico
QbD	Quality by design
QbT	Quality by testing
QTPP	Quality Target Product Profile
R ²	Coeficiente de determinação
R ² aj.	Coeficiente de determinação ajustado
RPM	Rotações por minuto
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
UV	Radiação ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Castanea sativa* Mill.

A *Castanea sativa* Mill. é uma espécie da família Fagaceae, que pode ser encontrada no sul da Europa (Figura 1), Ásia (principalmente na China) e a África (norte), sendo vulgarmente conhecida como castanheiro europeu ou doce. Trata-se de uma árvore de grande porte que existe em grande quantidade em Portugal, principalmente no norte e centro do país, e que representa cerca de 38.874 ha de área total, com uma produção de 34.100 toneladas de castanha ao ano, segundo estimativas de 2018 (1). A castanha destina-se essencialmente ao consumo interno e à exportação, principalmente para países como Espanha, Itália, França, Brasil, Reino Unido, EUA e Suíça (1,2).



Figura 1 - Mapa ilustrador da distribuição da castanha doce na Europa. A área marcada a verde, demonstra uma provável faixa de vegetação nativa e a cor laranja ilustra as áreas onde foi introduzida e cultivada desde a era neolítica. Adaptado de (3).

A castanha é composta pelo fruto, tegumento (casca interna), pericarpo (casca externa) e ouriço. Trata-se de um alimento tradicional e a sua árvore é altamente valorizada para produção comercial, devido a valores culturais, ecológicos, históricos e a questões estéticas. Atualmente, é utilizada pela indústria alimentar, cosmética, farmacêutica e da madeira e, devido a essa grande capacidade de gerar subprodutos, principalmente cascas

e ouriços, a cadeia de processamento da castanha tem vindo a crescer ao longo do tempo (4,5, 7).

A castanha é uma semente que pode ser consumida crua, cozida, assada, fervida ou até mesmo frita e pode ser comercializada na forma natural ou congelada. O processo de cozimento das castanhas altera as propriedades sensoriais das mesmas, melhorando o sabor e a textura, preservando algumas das características nutricionais e elevando o perfil de minerais e polifenóis (4,6,7).

Ao longo dos anos, a castanha tornou-se um importante pilar da nutrição humana, devido aos seus grandes benefícios para a saúde, sendo considerada um alimento com baixo teor de gordura, elevada presença de ácidos gordos insaturados, hidratos de carbono, fibras, proteínas, vitaminas e minerais (especialmente fósforo, potássio e ferro), possuindo igualmente elevados níveis de amido (2,9,10,11). A castanha é ainda uma importante fonte energética, com benefícios para a redução e/ou prevenção de doenças cardíacas, podendo ainda ser utilizada em dietas com restrição de glúten, nos casos de pacientes com doença celíaca (13,14).

Durante o processamento da fruta são gerados alguns subprodutos, entre eles folhas, cascas, ouriços e, em alguns casos específicos, flores (Figura 2) (7).

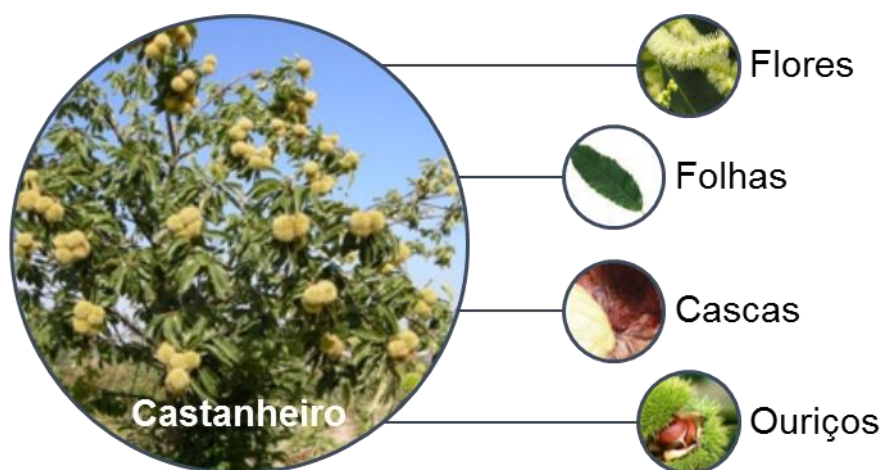


Figura 2 - Ilustração do fruto (ouriço) e dos diferentes subprodutos do castanheiro (folha, cascas e flores) (3,4,22,23).

Estes subprodutos são ricos em compostos bioativos que apresentam diversos benefícios para a saúde, como propriedades antioxidantes, anticarcinogénicas ou cardioprotetoras (7,15,16). Atualmente, há evidências científicas que corroboram os efeitos benéficos da flor da castanha no que toca a propriedades antitumorais e antimicrobianas (17). Neves e col. também descreveram benefícios de tisanas de folhas e flores de

castanheiro como mucolítico, antiespasmódico e antidisentérico, entre outros (18). Blaiotta e col. relataram que, devido à presença de fibras, o consumo de castanhas apresenta efeitos positivos no auxílio do trânsito intestinal (19). Além disso, um estudo conduzido por Mujic e col. comprovou que o extrato de castanha aumenta a viabilidade celular, protegendo o ácido desoxirribonucleico (ADN) contra danos oxidativos e melhorando o sistema antioxidante natural (20).

Recentemente, alguns autores têm discutido as propriedades antioxidantes dos extratos de casca de castanha, tendo-se observado a presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e taninos (condensados e hidrolisáveis) (5, 8, 9, 10, 21). Squillaci e col. (16) reportaram que o extrato de casca de castanha, além de apresentar ação antioxidante, também tem atividade anti-inflamatória, observando-se uma redução da produção de óxido nítrico, bem como da óxido nítrico sintetase induzível (responsável por catalisar a produção de óxido nítrico). Além disso, observaram uma capacidade de hidratação da pele e uma proteção do colagénio. Um estudo publicado por Rodrigues e col. (5) não só relatou as propriedades antioxidante presentes no extrato, como também a presença de alguns aminoácidos (em especial, arginina, leucina) e vitamina E.

1.1.1 Atividade antioxidante

A ação antioxidante relatada anteriormente deve-se à presença de compostos fenólicos, sobretudo nas folhas, cascas e ouriços (8,10). Os principais compostos fenólicos reportados são os ácidos fenólicos (ácido elágico e gálico), os flavonoides (rutina, quercetina e apigenina) e os taninos (condensados e hidrolisáveis) (8,10). Esta ação antioxidante é responsável pela inibição da formação e/ou impedimento da ação de radicais livres ou espécies não-radicaais, reduzindo o risco de doenças relacionadas com o stress oxidativo.

Diante disto, é importante elucidar que a formação de radicais livres é um processo fisiológico, sendo os radicais produzidos pelo próprio corpo humano através de processos metabólicos oxidativos. Estes radicais atuam como intermediários para a transferência de eletrões em diversas reações bioquímicas. Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões que possuem eletrões não emparelhados, sendo altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas. Esses radicais são derivados de oxigénio, azoto e enxofre, sendo, respetivamente, espécie reativas de oxigénio (ERO), azoto (ERN) e enxofre (ERS) (8).

A formação de ERO envolve a adição de um eletrão a uma molécula de oxigénio, originando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este, por sua vez, ao receber mais um eletrão e dois

iões de hidrogénio, conduz à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que, ao receber mais um eletrão e um ião de hidrogénio, forma o radical hidroxilo ($OH^\bullet$). Os iões de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ e conduzir à produção de $OH^\bullet$. Os radicais superóxido e hidroxilo possuem eletrões desemparelhados na órbita mais externa, sendo designados de radicais livres. Outras espécies podem também estar envolvidas na formação de ERO, como é o caso do óxido nítrico (NO), oxigénio singlete ($^1O_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^\bullet$). Estes metabólitos derivados do oxigénio, em conjunto, são denominados de espécies reativas de oxigénio (ERO) (17,24,25). Já a formação de ERN é derivada da reação do NO com o $O_2^{\cdot-}$, formando o $ONOO^\bullet$. Por fim, as ERS são formadas pela reação de ERO com tióis (17,25).

Estes processos metabólicos, em proporções apropriadas, são de extrema importância para o organismo, originando a formação de adenosina trifosfato (ATP), através das cadeias transportadoras de eletrões, bem como a ativação do sistema imunitário durante o processo de infeção, a ativação de genes e a produção de óxido nítrico, entre outros (26,27). No entanto, a produção excessiva conduz ao *stress* oxidativo. Este processo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e compostos antioxidantes, acarretando a oxidação de algumas biomoléculas e, consequentemente, a perda da função biológica e/ou o desequilíbrio homeostático, desestabilizando o sistema orgânico e resultando no dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos lesivos para os tecidos (27,28). Estes efeitos celulares e teciduais são responsáveis por patologias crónicas, entre elas a aterosclerose, a diabetes, a obesidade, os transtornos neurodegenerativos e o cancro (29). Além disso, um dos principais alvos do *stress* oxidativo é a pele, devido ao fato deste órgão estar constantemente sujeito a agressões externas, como por exemplo a radiação UV e as agressões ambientais. Alguns estudos comprovaram que o *stress* oxidativo tem relação direta com o envelhecimento cutâneo e algumas doenças da pele, como a psoríase, a dermatite atópica e o cancro (30,31,32,33). Sendo assim, o uso de produtos para a pele com ação antioxidante torna-se de extrema importância para a prevenção da ação dos radicais livres e de riscos associados ao *stress* oxidativo.

Os antioxidantes são substâncias que eliminam as EROs ou atuam regulando as defesas antioxidantes ou inibindo a formação de EROs (34,35). A atividade antioxidante pode ser devido a várias formas de atuação, sendo elas (i) a ação de oxidantes preventivos que atuam inibindo reações de oxidação de radicais livres e a formação de radicais lipídicos livres; (ii) através da interrupção do aumento da reação em cadeias da auto-oxidação; (iii) como inibidores singulares de oxigénio; (iv) através de sinergismos com outros antioxidantes; (v) como agentes redutores através da conversão de hidroperóxidos em

compostos estáveis; (vi) como quelantes metálicos, convertendo pró-oxidantes metálicos em produtos estáveis e (vii) através da inibição de enzimas pró-oxidantes (49).

O sistema antioxidante humano divide-se em antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (17). Os antioxidantes enzimáticos são divididos em defesas enzimáticas primárias ou secundárias, sendo as primárias formadas pela glutathione peroxidase, a catalase ou a superóxido dismutase, enquanto as defesas enzimáticas secundárias são compostas pela glutathione reductase e glucose-6-fosfato desidrogenase. Estas enzimas não neutralizam os radicais livres, mas atuam como suporte aos outros antioxidantes endógenos. Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos antioxidantes de origem endógena (como a vitamina A, os cofatores enzimáticos (coenzima Q10), os compostos nitrogenados (ácido úrico) e os péptidos (glutathione) ou exógena (vitamina C, vitamina E, zinco, selênio, β -caroteno, licopeno, luteína, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido elágico, flavonoides e outros) (17,36,37). É importante destacar que, embora o corpo humano possa apresentar um sistema antioxidante de autodefesa, muitas vezes este não é suficiente, levando a uma necessidade de complementar estes compostos, através da dieta, com a ingestão de doses apropriadas de antioxidantes de origem natural ou sintética (36).

Tal como anteriormente mencionado, os extratos de casca de castanha, objeto do presente estudo, apresentam propriedades antioxidantes devido à presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e taninos (condensados e hidrolisáveis), pelo que o presente trabalho irá relatar apenas tais compostos.

Os compostos fenólicos estão vastamente distribuídos na natureza, atuando como antioxidantes, eliminando radicais livres mediante a doação de átomos de hidrogénio ou eletrões, absorvendo radicais de oxigénio e atuando como quelantes de iões metálicos (38,39). A estrutura destes compostos é constituída por vários grupos benzénicos característicos, apresentando substituintes de grupos hidroxilo (40). Estes compostos estão divididos em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (Figura 3).

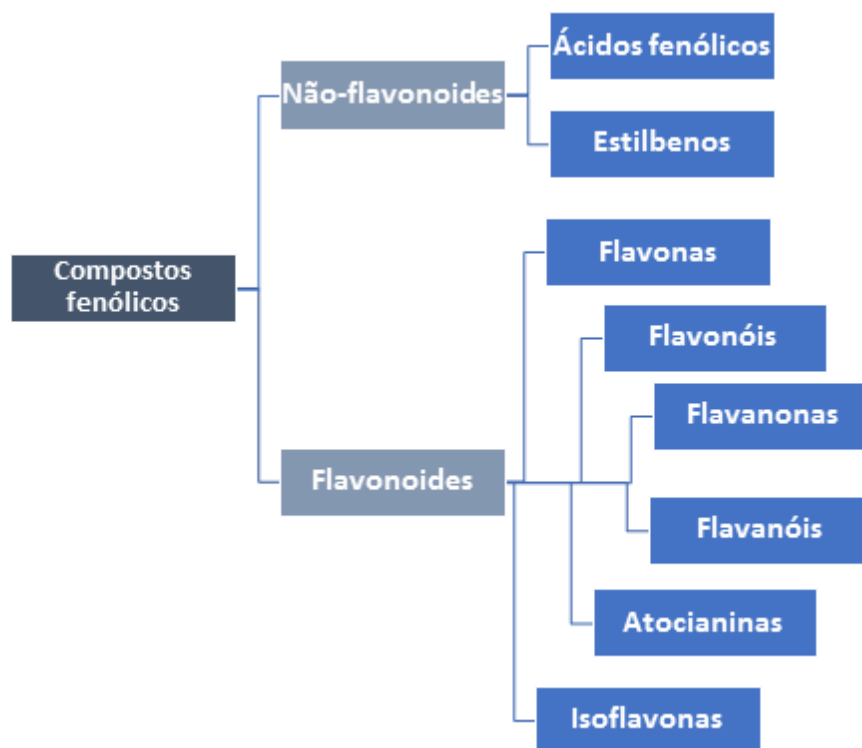


Figura 3 - Principais classes dos compostos encontrados nos subprodutos do castanheiro (40,42).

Os flavonoides representam o grupo mais comum e diversificado de origem vegetal, possuindo baixo peso molecular e sendo, de entre os compostos fenólicos, os que possuem maior diversidade estrutural devido à estrutura química que pode variar através de substituições, incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (36,41). Os flavonoides não podem ser sintetizados no corpo humano, podendo apenas ser ingeridos através da dieta. A estrutura química é constituída por um núcleo *flavilium* (Figura 4), composto por três anéis fenólicos designados como anel A, B e C. O anel benzeno A é condensado com um anel de 6 membros (C), tendo na posição 2 como constituinte um anel fenilbenzeno (B). Todavia, o anel C pode ser do tipo pirano heterocíclico, o qual é responsável por produzir flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou por pirona, responsável por originar flavonóis, flavonas e flavanonas (41,42).

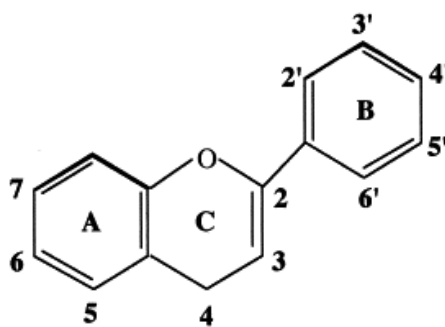


Figura 4 - Estrutura química geral dos flavonoides. Adaptado de (42).

Atualmente estão descritos diferentes tipos de flavonoides e a sua atividade biológica, bem como dos metabólitos gerados, depende da estrutura química e das variações na orientação da molécula do flavonol (42). Diante das diversas possibilidades de padrões de substituição nos anéis A, B e C, surgem vários subgrupos. Portanto, os flavonoides são divididos de acordo com o nível de oxidação do anel C ou na hidroxilação do anel na posição C3 e C4. As classes de flavonoides mais encontrados são os flavonóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, atocianinas e isoflavonas (42,43,44). A Tabela I resume as principais classes e subclasses dos flavonoides disponíveis.

Tabela I - Estrutura química de alguns flavonoides. Adaptado de (41).

Fórmula estrutural	Flavonoides
Flavanona	Eriodictiol Hesperitina Naringenina
Flavonóis	Catequina Gallocatequina
Flavonas	Apigenina Chrisina Leteolina
Flavonóis	Kamferol Miricetina Quercetina Rutina
Atocianinas	Taxifolina
Isoflavonas	Daidazina Genisteína Gliciteína Formononetina

As propriedades antioxidantes destes compostos devem-se à atuação como agentes redutores (óxido-redução), inibição de oxigénio singlete (espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigénio molecular), peróxido em decomposição ou doadores de hidrogénio através de reações biológicas, desempenhando função na absorção e estabilização de radicais livres envolvidos no processo oxidativo, através de processos de hidrogenação ou complexação em espécies (41,45,46). Além da sua eficácia como antioxidantes, os flavonoides também demonstraram eficiência como agentes antimicrobianos, antivirais, anti-hipertensores, antitumorais, anti-inflamatórios e imunomoduladores (47,48). A sua ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, eicosanóides e moléculas de adesão (49).

Os compostos fenólicos do tipo não-flavonoides são os estilbenos e os derivados de ácido fenólico. Os estilbenos apresentam dois grupos hidroxilo na posição meta, enquanto o anel B está substituído por grupos hidroxilo e metoxilo nas posições orto, meta e/ou para (Figura 5). Este grupo está presente, principalmente, nas uvas e no amendoim, sendo o resveratrol o principal exemplo deste grupo (50).

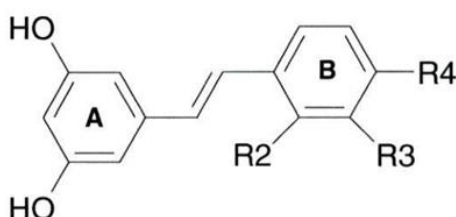


Figura 5 - Estrutura química do composto fenólico do tipo não-flavonoides do grupo estilbenos. Adaptado de (50).

Os derivados de ácido fenólico podem ser divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos (Figura 6). Os ácidos fenólicos são constituídos por um anel aromático, um grupo funcional carboxilo ($\text{-CO}_2\text{H}$) e um ou mais grupos hidroxilo (-OH) e/ou metoxilo (-OCH_3) (51). Os derivados de ácidos hidroxibenzóicos apresentam um anel fenólico e um grupo carboxilo, o que os caracteriza como ácidos; em contrapartida, os ácidos hidroxicinâmicos são derivados dos fenilpropanoides, apresentando um grupo carboxilo inserido na cadeia lateral (52,53).

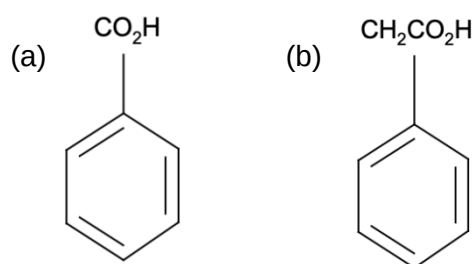


Figura 6 - Moléculas de compostos fenólicos do tipo não-flavonoides, derivados de ácido fenólico (a) Molécula do ácido hidroxicinâmico e (b) Molécula do ácido hidroxibenzoico.

Adaptado de (54).

A sua atividade antioxidante está relacionada com as propriedades redutoras da estrutura, a qual funciona como sequestrador de radicais ou atua como quelante de metais de transição, envolvendo-se tanto nas etapas de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários que são formados a partir destas reações são considerados estáveis, devido à ressonância do anel aromático que é demonstrada por essas substâncias (51).

Os principais compostos da classe dos ácidos hidroxibenzóicos que se destacam são o ácido *p*-hidroxibenzoico, o ácido protocatéquico, o ácido gálico, o ácido siríngico e o ácido vanílico; já os da classe dos ácidos hidroxicinâmicos destacam-se o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinapínico.

Com efeito, diante do que foi exposto e considerando os componentes reportados até ao momento nos extratos de cascas de *C. sativa*, estes são uma boa opção para incorporação como ingrediente ativo em preparações semissólidas cutâneas. A presença de compostos fenólicos que atuam como antioxidantes é um fator favorável à prevenção do envelhecimento cutâneo (40,41,42,53,55). Os compostos fenólicos também têm demonstrado ser eficazes para as dermatites de contato, lesões da pele e através da atuação como inibidor dos mediadores envolvidos na resposta imunitária, atestando assim suas propriedades anti-inflamatórias (56,57). A vitamina E também tem comprovada eficácia através das suas propriedades antioxidante (5). Além disso, há atualmente uma preferência por parte do consumidor em substituir os produtos sintéticos por produtos naturais, devido à menor probabilidade de causarem efeitos secundários.

1.2 Quality by Design

1.2.1 Conceito *quality by design*

Desde a antiguidade que a qualidade de um produto ou de algum serviço é um tema que causa enorme preocupação. Até à década de 60 do século passado não havia qualquer tipo de controlo da qualidade por parte das indústrias produtoras de bens e, na maioria dos países, não eram realizados registos de tudo que era produzido. Entretanto, já entre as décadas de 60 e 70, ocorreu um avanço em publicações de leis, regulamentos e diretrizes no que diz respeito a garantir a eficácia, segurança e qualidade dos produtos. O avanço do contexto regulamentar farmacêutico está relacionado com as práticas de desenvolvimento e fabrico adotadas nas décadas de 1970 a 1990 (58).

Com o passar do tempo, novos conceitos de qualidade foram compreendidos e levaram Joseph M. Juran, ao desenvolvimento do conceito *Quality by Design* (QbD), como uma abordagem revolucionária para integrar a qualidade desejada nos produtos e serviços. A introdução do conceito QbD foi assim proposta por Juran, no ano de 1992, no qual se acreditava que os problemas referentes à qualidade de um produto estavam associados ao modo como ele era idealizado e que a qualidade de um produto não deveria ser testada e sim projetada (59,60).

O QbD é definido pela *Guideline ICH Q8* como “*uma abordagem sistemática para o desenvolvimento que começa com os objetivos pré-definidos e produtos enfatizados e conhecimento de processos e controle de processos, baseado na ciência e na qualidade da gestão do risco*”. Assim, este conceito propõe que o desenvolvimento do produto e o processo de fabrico sejam efetuados de forma planeada, de modo a garantir a qualidade do produto final seguindo especificações previamente definidas (61).

A abordagem do *QbD* indica uma transformação em que afasta a abordagem tradicional (*Quality by testing*, QbT), praticada pela maioria das indústrias ainda no início do século XXI, levando-as a realizar uma prática baseada no conhecimento prévio de todo o processo e análise científica do risco. Tendo em vista as diferenças existentes entre um processo baseado no conceito QbD e o QbT, o primeiro enfatiza que a qualidade não deverá ser testada nos produtos e sim estabelecida pelo projeto, ou seja, planeada e incorporada nos produtos (61).

A abordagem tradicional recomenda que para obter a qualidade do produto, o processo deverá ser executado dentro de uma faixa restrita de operação, ou seja, o processo define o produto e as especificações são definidas baseadas no desempenho do processo. Neste caso, por se tratar de uma abordagem empírica, pode-se observar

problemas relacionados com o processo de fabrico que muitas vezes são mais difíceis de se identificar, além da dificuldade de observar a causa raiz desse problema e os gastos desnecessários relacionados com ele. Além disso, neste tipo de abordagem há uma maior dificuldade em conhecer as variabilidades de todo processo, o que dificulta o processo de escalonamento fabril. Já na abordagem QbD o produto define o processo. Entretanto, a qualidade do produto é aceitável desde que o processo permaneça dentro do seu *Design Space* (DS), sendo as especificações do produto baseadas no conhecimento prévio do processo e do produto (61,62).

Segundo o artigo de revisão de Yu e col. (63), os objetivos do QbD são:

- Alcançar especificações de qualidade de produto baseadas no desempenho clínico;
- Aumentar a capacidade do processo e reduzir a variabilidade e os defeitos do produto, aprimorando o *design*, a compreensão e o controlo do produto e do processo;
- Aumentar as eficiências de desenvolvimento e fabrico dos produtos;
- Melhorar a análise da causa dos erros e a gestão de alterações pós-aprovação.

1.2.2 Elementos da QbD

Segundo a *Guideline* ICH Q8, o desenvolvimento seguindo o conceito QbD requer conhecimento e compreensão dos elementos e ferramentas fundamentais a serem utilizados. Os elementos do QbD são integrados e têm como objetivo evidenciar como um produto farmacêutico ou cosmético deve ser desenvolvido, considerando tanto as necessidades do paciente quanto os pontos críticos avaliados pela empresa (61). Esta *Guideline* sugere a inclusão dos seguintes elementos:

- Definição do perfil de qualidade alvo do produto (*Quality Target Product Profile* - QTPP)
- Identificar potenciais atributos críticos de qualidade (*Critical Quality Attributes* - CQAs)
- Vincular atributos de matéria-prima (CMA) e parâmetros de processo (CPP) a CQAs e executar a avaliação de riscos
- Desenvolvimento de um *design space*
- Projeto e implementação da estratégia de controlo

- Melhoria contínua

1.2.2.1 Perfil de qualidade alvo do produto

O perfil de qualidade alvo do produto (*Quality Target Product Profile – QTPP*) é o primeiro elemento a ser considerado e envolve questões de qualidade, eficácia e segurança de um produto. É utilizado para iniciar as atividades baseadas no QbD prevendo os objetivos e as metas a serem alcançadas no final, tendo por definição: “*Um sumário prospectivo das características de qualidade de um medicamento que, idealmente, será alcançado para garantir a qualidade desejada, levando em conta a segurança e eficácia do medicamento*” (61).

Trata-se de um documento que contempla um resumo das características fundamentais do produto pretendido (produto acabado), no qual tais características são baseadas através de um conhecimento prévio, experiências passadas e informações através da literatura científica, podendo ser atualizado durante o ciclo de vida do produto, conforme o conhecimento do produto e do processo for aumentando, de modo a atender as necessidades do paciente (64). Um artigo de Raw e col. (65) relata a importância da elaboração do QTPP de forma adequada antes da condução do desenvolvimento do produto, uma vez que na ausência de um QTPP bem estabelecido pode resultar em perda de tempo e recursos valiosos.

Em um documento ideal de QTPP, devem ser incluídas as considerações com uma visão de todo ambiente clínico, informações gerais do produto (folheto informativo e resumo das características do medicamento), sistemas de liberação, formas de dosagem, vias de administração, sistemas de acondicionamento, forma física do produto, atributos que afetam as características farmacocinéticas, como por exemplo, a dissolução, o desempenho aerodinâmico, a estabilidade, a pureza e a esterilidade, ou seja, este deverá considerar todos os aspectos importantes no desempenho para o paciente (61).

1.2.2.2 Atributo Crítico de Qualidade, Parâmetros Críticos de Processo e Atributo Crítico dos materiais

A segunda etapa do desenvolvimento baseado em QbD é identificar os atributos críticos de qualidade (ACQ ou *Critical Quality Attribute – CQA*) e este elemento é derivado da descrição do QTPP. É definido pelas propriedades ou características físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas, dentro de um limite apropriado, no qual tem como intuito garantir a qualidade predefinida do produto. Esses atributos de qualidade devem ser estudados, controlados e garantidos durante o desenvolvimento e o processo de fabricação do produto (61).

Alguns elementos essenciais do conceito QbD podem impactar diretamente nos CQAs; é o caso dos atributos críticos dos materiais (CMAs) e do parâmetro crítico de processo (CPP).

Os atributos críticos dos materiais (CMAs) são as características físico-químicas, biológicas ou microbiológicas, sendo elas, características qualitativas e quantitativas das substâncias ativas/ ingredientes ativos e excipientes, dentro de um limite ou intervalo adequado de modo a garantir a qualidade desejada (58). Os CMAs são considerados diferentes dos CQAs, uma vez que os CQAs são categorizados como materiais de saída (produto acabado) e os CMAs materiais de entrada (63).

Já os CPPs são os parâmetros críticos do processo e estão relacionados com os parâmetros do processo; estes são definidos como parâmetros operacionais de entrada, por exemplo, velocidade e taxa de fluxo ou variáveis de estado do processo, por exemplo, temperatura e pressão, de uma etapa do processo. Os CPPs são categorizados como um parâmetro que possui um papel significativo na qualidade do produto, sendo denominado como crítico pelo facto de sua variabilidade afetar um CQA e devido a isso, necessitam ser avaliados e controlados, a fim de garantir a consistência no desempenho do processo e garantir a qualidade do produto final, porém os que não apresentam variabilidade e impacto no CQAs, são tratados como parâmetros não críticos do processo (58,63,66).

Pode ser visto na Figura 7 o relacionamento entre CMAs e CPPs sendo categorizados como materiais de entrada e os CQAs como de saída, em uma operação unitária no processo de fabrico, sendo os “elementos” da abordagem QbD essenciais para estruturar e aperfeiçoar o processo.



Figura 7- Ilustração da relação entre os materiais de entrada (CMAs e CPPs) e materiais de saída (CQAs) de uma operação unitária no processo de fabrico. Adaptado de (63).

1.2.2.3 Gestão do risco da qualidade

Com o avanço do conceito QbD, a gestão do risco de qualidade (*Quality Risk Management* - QRM) tornou-se um processo primordial no desenvolvimento dos produtos, uma vez que esta abordagem é baseada em ciência e gestão do risco na qualidade e tem como principais objetivos identificar os riscos dentro dos processos, analisar a importância desse risco e propor medidas para minimizar os riscos (67).

Primeiramente, é necessário elucidar a definição de risco, que se trata de “a combinação da probabilidade de ocorrência de dano e a gravidade desse dano”. Diante disso, a gestão do risco de qualidade suporta uma abordagem científica e prática para a tomada de decisões, avaliando a probabilidade, a gravidade e a capacidade de detectar o risco (68).

A gestão do risco da qualidade poderá ser utilizada em diferentes etapas do ciclo de vida do produto (Figura 8) e não apenas no desenvolvimento do produto, uma vez que durante o desenvolvimento ou no fabrico comercial não é possível identificar todos os detalhes do produto e do processo (68).

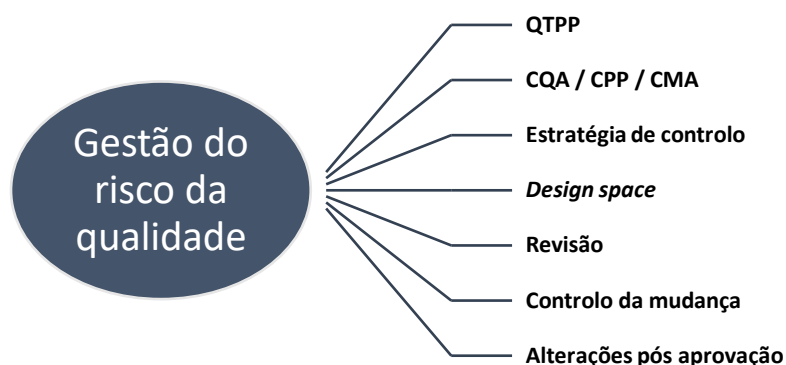


Figura 8 – Aplicações da gestão do risco de qualidade durante o ciclo de vida de um produto segundo a Guideline ICH Q9.

Há diversas maneiras de avaliar os riscos, dentre elas estão o conhecimento prévio do produto, dados da literatura científica, dados laboratoriais, experiências clínicas e não-clínicas, procedimentos empíricos e procedimentos internos, observações e tendências (68). Entretanto, há também diversas ferramentas que poderão ser utilizadas para a gestão do risco para auxiliar na identificação e na classificação de riscos que possam impactar na qualidade do produto. A *Guideline* ICH Q9 evidencia uma grande listagem de ferramentas de avaliação do risco que poderão auxiliar tanto as indústrias quanto as entidades regulamentares. Essas ferramentas são utilizadas para identificar e

classificar os riscos que terão impacto na qualidade do produto, baseado no conhecimento prévio e em dados experimentais iniciais (61,68).

1.2.2.4 Desenho de Experiências

O *Design of Experiments* (DoE), traduzido em português como Desenho de Experiências, não é um conceito novo, tendo surgido na década de 1920 pelo estatístico Sir Ronald Fisher. Na QbD este conceito foi abordado pela FDA através da *Guideline* ICH Q8, a qual tem por definição uma abordagem experimental que permite utilizar métodos estruturados e organizados com o intuito de avaliar o impacto e entender as possíveis interações entre os fatores que afetam um processo (*inputs*) e a variável de resposta desse processo (*output*) (61).

Uma vez que no desenho de experiências se trata de termos como “Fatores ou variáveis independentes”, “Níveis” e “Respostas ou variáveis dependentes”, é pertinente introduzir e definir estes termos-chave. Fatores ou variáveis independentes são as variáveis experimentais que podem ser alteradas de forma independente uma da outra. Os fatores são as variáveis de entrada que, no caso do desenvolvimento farmacêutico, são categorizadas como os atributos do material (matéria-prima ou excipientes) e os parâmetros do processo (velocidade, tempo, temperatura e etc.) (63,69).

As respostas ou variáveis dependentes são os valores que são mensurados nos resultados das experiências. São os parâmetros de saída, que são decorrentes de uma variação nas variáveis de entrada, sendo categorizados como os atributos críticos de qualidade (produto final, uniformidade da mistura, tamanho de partícula, ensaio de comprimido, uniformidade de conteúdo, liberação do princípio ativo) (63,69,70). Por fim, quando se fala em níveis de uma variável, está-se a referir aos valores diferentes de uma variável na qual as experiências devem ser realizadas, por exemplo, se num processo a variável temperatura será testada em três temperaturas diferentes poderá ser investigada em três níveis na otimização de um método (70).

O DoE é uma técnica de engenharia que se baseia num conjunto de experiências compostas por diferentes combinações, com mudanças propositadas das variáveis, e que, ao ser aplicado experimentalmente, observa e identifica mudanças que correspondem às respostas, ou seja, utiliza-se um ou mais fatores que são alterados com intuito de observar o efeito numa ou mais variáveis de resposta.

O DoE permite controlar sistematicamente os fatores de acordo com planeamentos pré-estabelecidos e fornece uma melhor compreensão quanto aos efeitos e à relação entre CMAs, CPPs, CQAs, além de propor o *design space* ideal (63). Os fatores a serem

estudados numa DoE poderão ser originados através da avaliação inicial do risco, usando conhecimento prévio, princípios científicos e os objetivos das partes interessadas (71).

A partir da escolha dos fatores e da determinação das respostas é importante entender a relação entre as alterações que foram propostas nos fatores (x_i – variáveis independentes) com as alterações das respostas (y_i – variáveis dependentes) obtidas, ou seja, estimar os efeitos que os fatores possuem numa resposta. Isto pode ser visualizado através de modelos matemáticos, sendo esta relação caracterizada pelo modelo representado na Equação (72):

$$y = f(x_i) \quad \text{Equação 1}$$

Como as técnicas de DoE exigem uma grande quantidade de cálculos, para evitar um trabalho dispendioso é importante o investimento em *software*, ferramentas computacionais de projetos e análise estatística (73). Os métodos estatísticos são importantes para que a conclusão seja objetiva e não baseada em suposições. As ferramentas gráficas também auxiliam a identificar os efeitos dos fatores e as interações significativas. Além disso, o uso de técnicas de apresentação e análise também é um bom recurso para esta etapa, como por exemplo, gráficos, estatística descritiva, análise de variância, análise de regressão, teste T, etc. É importante que os resultados sejam avaliados tanto estatisticamente quanto em relação às teorias estabelecidas (74,75).

Contudo, diversos tipos de modelos de estudos podem ser realizados. Estes são subdivididos em duas categorias: a) *screening designs* (planos de triagem) e b) *optimization designs* (planos de otimização). O *screening designs* possibilita estudar um amplo número de fatores de entrada com números reduzidos de experiências e, geralmente, é utilizado para identificar quais os parâmetros que possuem impacto num CQA. Já os *optimization designs* se estuda um número reduzido de fatores de entrada, em que se almeja um melhor entendimento entre as relações e estabelecem modelos matemáticos que ajudam a encontrar o que precisa ser ajustado para obter o resultado desejado dos CQAs (72,73). Os planos experimentais estatísticos mais conhecidos encontram-se resumidos na Tabela II.

Tabela II - Planos experimentais estatísticos mais conhecidos, com resumo de suas características (72).

Categoria	Desenho experimental	Experiências	Níveis	Fatores	Aplicação
Triagem	Plano Plackett-Burman	N	2	$< N-1$	Estuda um amplo número de fatores de entrada com um número reduzido de experiências.
	Plano fatorial fracionário	2^{k-p} Res	2	$k > 4$	
	Plano fatorial completo a 2 níveis	2^k	2	$2 < k < 5$	
Otimização	Plano Box-Behnken	$2k(k-1)+C$	3	$3 < k < 5$	Estuda um número reduzido de fatores de entrada.
	Plano composto central	2^k+2K+C	5	$2k < 5$	
	Plano fatorial a 3 níveis	3^k	3	$2 < k < 3$	

k é o número de fatores; p é o número de geradores escolhidos para fracionar o desenho; C refere-se ao número de pontos centrais.

No presente trabalho serão explorados somente o modelo de otimização do tipo planeamento Box-Behnken e a metodologia de superfície de resposta, pois foram os modelos escolhidos para estudo.

1.2.2.4.1 Modelos de otimização

O processo de otimização é uma prática de apoio no desenho de experiências e que consiste nas condições ou configurações ideais de uma experiência, ou seja, determinar as condições ótimas a serem trabalhadas (72,74). Os desenhos experimentais do tipo planeamento fatorial de três níveis, composto central e Box-Behnken são os planos mais utilizados como modelo de otimização. Estes planos utilizam 3 e 5 níveis para cada fator de entrada, o que favorece a obtenção de modelos mais complexos para efetuar os desenhos de superfície de resposta de segunda ordem ou quadrática, sendo essa a diferença quando comparado aos planos de triagem (que utilizam apenas 2 níveis para cada fator de entrada). Isto permite apenas modelos de superfície de resposta de primeira ordem ou modelos lineares. Os modelos de otimização que estudam um menor número de fatores de entrada apresentam algumas vezes um maior número de experiências a serem realizadas (74,75).

Os planos fatoriais completos de três níveis são utilizados quando há necessidade de se estudar dois ou três fatores de entrada, gerando um grande número de experiências

(74). Para este tipo de plano, nos casos em que o número de fatores é superior a 2, a aplicação em métodos de superfície de resposta é limitada, uma vez que, como o número de experiências é muito elevado quando comparado aos outros planos (como Box-Behnken e o composto central) apresentam um número menor de pontos experimentais, perdendo a eficiência (Figura 9(a)) (70). O plano composto central é bastante utilizado, uma vez que utiliza 5 níveis de cada fator de entrada com um número reduzido de experiências quando comparado ao plano fatorial completo de três níveis (Figura 9 (b)) (70,74).

Na Figura 9 encontra-se ilustrada uma representação espacial 3D dos planos fatoriais de três níveis, composto central e Box-Behnken (que será o plano de otimização a utilizar neste trabalho).

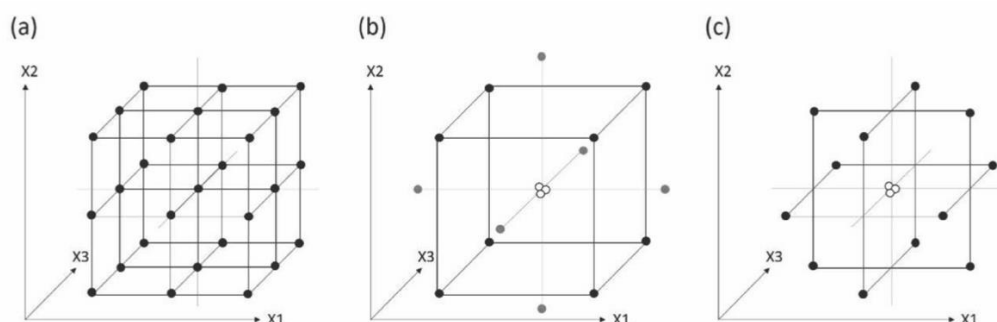


Figura 9 - Ilustração em representação espacial 3D de matrizes (a) plano fatorial completo de três níveis, (b) plano composto central e (c) plano Box – Behnken para três variáveis. Imagem retirada de (72).

1.2.2.4.2 Plano Box-Behnken

O plano Box-Behnken foi desenvolvido em 1960 por George E. P. Box e Donald Behnken (76) e consiste num modelo que utiliza três níveis de fatores, que não têm pontos de vértices, sendo assim, por vezes, preferidos aos modelos de composto central, pois quando há impedimentos físicos, eles impedem a utilização de pontos de vértices, i.e., quando todos os níveis dos fatores estão no extremo. Este plano permite obter modelos de superfície de resposta de primeira e segunda ordem (74). Os níveis de fatores ajustados em três níveis são categorizados como baixo (-1), médio (0) e alto (+1), apresentando intervalos igualmente espaçados entre eles (70). Trata-se de um modelo esférico e rotativo, onde o arranjo dos níveis no plano permite que o número de pontos aumente na mesma proporção que o número de coeficientes polinomiais. Assim, pode-se observar que com três fatores, por exemplo, pode ser efetuado um desenho contendo três blocos de quatro experiências, formando um desenho fatorial completo de dois fatores com o nível do

terceiro fator definido em zero (77,78). Entretanto, a representação gráfica deste plano pode ser observada de duas formas, como um cubo que possui um ponto central e pontos médios nas arestas (Figura 10(a)) ou como uma figura com um ponto central e três planos fatoriais 2^2 interligados, conforme mostrado na Figura 10 (b) (79).

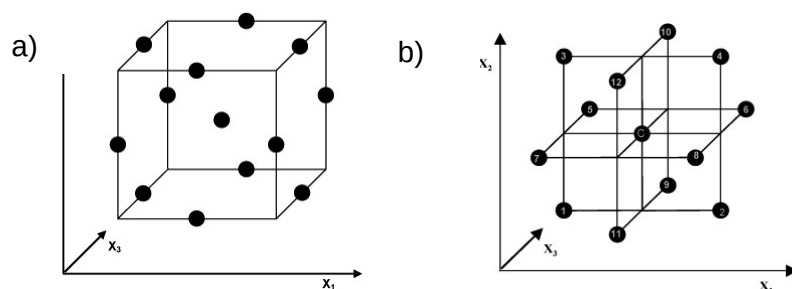


Figura 10 - Ilustração em representação espacial 3D (a) o cubo para Box-Behnken e (b) três plano fatoriais 2^2 . Imagem retirada de (79).

O número de experiências (N) necessário para desenvolver o plano Box-Behnken é definido pela Equação:

$$N = 2k(k - 1) + C_p \quad \text{Equação 2}$$

onde, k representa o número de fatores e C_p representa o número de pontos centrais.

Quando comparado ao plano fatorial de três níveis, o plano Box-Behnken é um modelo caracterizado como mais económico, especialmente nos casos de fatores de entrada superiores a 2 (70). Isto pode ser visualizado, ao observar a Figura 9 (c), em que é possível verificar 13 pontos experimentais no plano Box-Behnken para otimização de três variáveis em comparação com a Figura 9 (a) do plano fatorial completo de três níveis que apresenta 27 experiências.

1.2.2.4.3 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia da superfície de resposta (*Response surface methodology – RSM*) é um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos que tem como intuito modelar e analisar os problemas das experiências, planejar modelos, avaliar os efeitos de fatores, investigar a condição ideal dos fatores para as respostas desejadas e otimizar a superfície de resposta que é influenciada por vários parâmetros do processo (78).

Esta metodologia engloba um conjunto de técnicas: (i) projetar um conjunto de experiências com o intuito de medir adequadamente e de forma confiável a resposta de

interesse; (ii) desenvolver um modelo matemático de superfície de resposta que melhor se ajusta; (iii) encontrar o conjunto ideal de parâmetros experimentais que produzam um valor máximo ou mínimo de resposta e; (iv) representar os efeitos diretos e interativos das variáveis dos parâmetros do processo através de gráficos bidimensionais e tridimensionais (80).

Em resumo, a relação entre os fatores e a variável resposta num processo, em geral, não são conhecidas. Assim, na otimização de um desenho de experiências espera-se que seja determinada a condição ideal de operação de um processo para obter um ponto ótimo (máximo, mínimo ou alvo) para a variável resposta. A determinação deste ponto ótimo pode ser vista através da aplicação de uma Equação que represente a relação entre os fatores ($x_1, x_2, \dots, x_k$) e a variável resposta (y), no qual, se todas as variáveis forem consideradas mensuráveis, a superfície de resposta poderá ser expressa através da Equação (78):

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad \text{Equação 3}$$

A função f define uma superfície de resposta e, como o objetivo é otimizar a variável resposta (y), é importante que seja encontrada uma aproximação adequada entre as variáveis independentes e a superfície de resposta. De modo geral, utiliza-se um modelo de segunda ordem (quadrático) na metodologia de superfície de resposta, que pode ser visto pela Equação (78,80):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Equação 4}$$

em que, $x_1, x_2, \dots, x_k$ representam os fatores de entrada que influenciam as respostas y , β_0 , β_i ($i = 1, 2, \dots, k$), β_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$; $j = 1, 2, \dots, k$) representam os parâmetros que são desconhecidos e ε corresponde a um erro aleatório (78,80).

Assim, quando uma variável resposta é representada através de gráficos em função de um ou mais fatores obtém-se uma imagem de uma superfície de resposta. A escolha do modelo de desenho experimental confiável é muito importante, tendo em vista que é através dos resultados obtidos neste que é possível gerar uma aproximação da resposta da variável (superfície resposta) sobre o *design space*, ou seja, as superfícies ao se sobrepor permitem encontrar uma região experimental que possa satisfazer todas as respostas estudadas (81).

1.2.2.5 Espaço de concepção (Design Space – DS)

Design space (DS), em português “espaço de concepção”, é um conceito definido como uma combinação e interação multidimensional das variáveis de entrada (por exemplo, atributos do material) e dos parâmetros do processo, esperando-se que a operação dentro deste espaço resulte num produto que assegure que as especificações sejam cumpridas e a qualidade do produto garantida (61).

O DS trata-se de um espaço virtual, geralmente, um espaço robusto que integra valores para as possíveis variáveis, com o intuito de cumprir todos os CQAs do produto. Não sendo um procedimento obrigatório, é incentivado pelas autoridades sanitária (61,98).

Diferentes métodos para a implementação de um espaço de concepção são viáveis e aceites pelas entidades reguladoras, como por exemplo, intervalos de processos, expressões matemáticas ou controlos de *feedback* para ajuste de parâmetros durante o processo (82). Entretanto, o desenho de experiências é um método comumente utilizado na construção do DS (83).

O DS é o resultado direto da análise dos dados do *Design of Experiments* (DoE), no qual a região do espaço é estabelecida através da otimização de gráficos de sobreposição de respostas em função de fatores de entrada (Figura 11) (72).

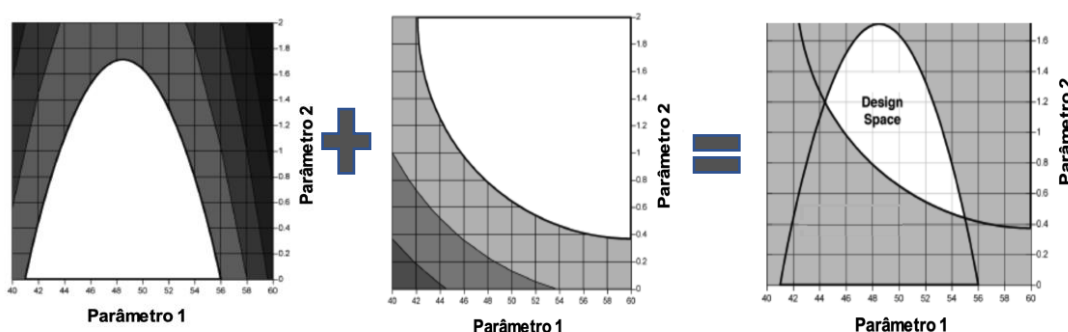


Figura 11 - Representação gráfica do design space (região branca) obtido a partir da sobreposição dos intervalos de respostas de saída em função dos fatores de entrada (Parâmetros 1 e 2). Fonte: Imagens retiradas e adaptadas da Guidance ICH Q8 (R2) (61).

Neste contexto, para a descrição do DS poderão ser utilizados intervalos de atributos de materiais e parâmetros de processo ou até modelos matemáticos sofisticados, apresentando uma descrição dos que foram incluídos, bem como o seu efeito na qualidade no produto.

A empresa poderá estabelecer um único DS que abranja várias operações ou optar por estabelecer DS independentes para uma ou mais operações. No primeiro caso há uma

maior flexibilidade operacional, uma vez que engloba todo o processo, em contrapartida, um DS separado possui uma maior simplicidade para se desenvolver (61).

O DS é caracterizado como uma região dentro de um espaço de conhecimento que permite o fabrico de um produto num determinado espaço operacional (84). O DS possui um espaço maior que o intervalo operacional, o que promove um espaço robusto de trabalho. Entretanto, alterações fora deste espaço implica em uma revisão em todo estudo realizado na etapa de desenvolvimento do produto (98).

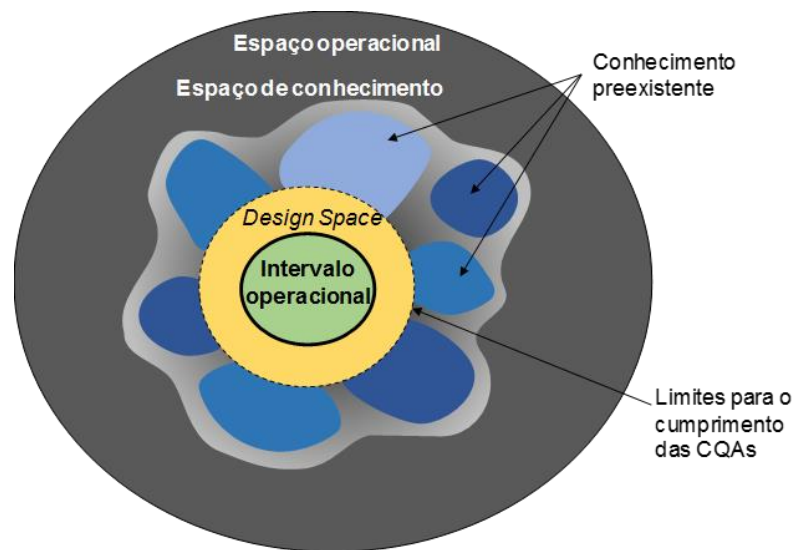


Figura 12 - Representação do Design Space; adaptado de (84). Legenda: Espaço operacional - Todos os possíveis valores que pode tomar uma variável; Espaço de conhecimento - Conhecimento sólido e robusto do comportamento de uma variável dentro dos seus limites de qualidade; Conhecimento preexistente - Literatura, experiência, empirismo, informação do fornecedor, etc.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo da presente dissertação foi o desenvolvimento de uma formulação tópica semissólida com extrato de cascas de *Castanea sativa* seguindo o conceito “*Quality by design*”. Os objetivos específicos foram:

- Definir o QTPP, identificar os atributos críticos da qualidade, os atributos críticos dos materiais e os parâmetros críticos do processo que afetam diretamente a qualidade do produto;
- Desenvolver uma formulação otimizada aplicando ferramentas de DoE, utilizando planeamento Box-Behnken e demonstrando as leituras das respostas através da metodologia de superfície resposta;
- Caracterizar as formulações para um melhor entendimento das mesmas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

No desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas as matérias-primas e os equipamentos descritos nas Tabelas III e IV.

Tabela III - Matérias-primas utilizadas na preparação do creme hidrófilo.

Matéria-prima	Lote	Fabricante	País
Álcool cetílico	0090140	Guinama	Espanha
Cera branca	180718	Acofarma	Espanha
Glicerina	190566-P-1	Acofarma	Espanha
Laurilsulfato de sódio	0086601	Guinama	Espanha
Nipagin (Metilparabeno)	180545-J-3	Acofarma	Espanha
Nipasol (Propilparabeno)	190168-J-1	Acofarma	Espanha
Óleo de coco	0079104	Guinama	Espanha
Óleo de macadâmia	02180458	Galeno	Espanha
Água purificada	LAB. MTF	LAB. MTF	Portugal
Extrato de cascas de <i>castanea sativa</i>	InnovCat	InnovCat	Portugal

Tabela IV - Equipamentos utilizados na preparação do creme hidrófilo.

Equipamento	Marca	Modelo	País
Balança	Ohaus Adventurer	ARC120	China
Balança analítica	Radwag	AS 220.R2	Polónia
Banho termostatzado	Nahita	601/5	Alemanha
Agitador em hélice	Heidolph	RZR 2041	Alemanha
Placa de aquecimento	IKA	C – MAG HS 7	Alemanha
Reómetro	Malvern	Kinexus Lab+	Alemanha
Difratómetro laser	Malvern	MAZ 3000	Reino Unido
Medidor de pH	Crison	pH-Meter Basic 20	Espanha
Texturómetro	Stable Micro Systems	TA-XT2i	Reino Unido
Colorímetro	Minolta	CR 400	Espanha
Estufa 25°C	Dias de sousa Anders	504/AST	Portugal

3.1.1 Matérias-primas

Numa preparação semissólida, além da escolha das substâncias ativas ou ingredientes ativos, a escolha das outras matérias-primas é igualmente importante. Diante disto, a indústria cosmética procura desenvolver preparações recorrendo a uma vasta gama de matérias-primas disponíveis e à utilização de tecnologias para obter o efeito desejado, mantendo uma perspectiva atraente no produto final.

A seleção dos excipientes ocorre na fase de pré-formulação, mediante a escolha da forma física do produto pretendido, a compatibilidade entre os demais componentes da formulação, a via de administração, o perfil de segurança do produto, o processo de fabrico e os aspetos regulamentares. A escolha dos excipientes deve ser realizada de forma cautelosa, uma vez que estes influenciam o desempenho do produto final, interferindo na capacidade de fabrico e na estabilidade do produto (85). Diante disto, esta seleção deverá ser baseada na forma física desejada, nos excipientes atualmente autorizados, bem como na concentração permitida. Neste caso, no momento da escolha, recorre-se às listagens presentes nas regulamentações vigentes, através das farmacopeias e de informações toxicológicas obtidas através de bases de dados como a FDA (*Food and Drug Administration*) - GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e o CIR (*Cosmetic Ingredient Review*) (86,87).

A avaliação da compatibilidade entre os excipientes e a substância ativa ou o ingrediente ativo é de extrema importância, de modo a evitar a ocorrência de falhas e possíveis incompatibilidades no produto final. Assim, deve-se recorrer a literatura científica para avaliar a possibilidade de interações entre as matérias-primas propostas.

No presente trabalho, foram escolhidas matérias-primas que são amplamente utilizadas pela indústria cosmética, tendo como objetivo preparar um produto final com a garantia de segurança, eficácia e qualidade desejada. Além disso, a escolha foi também baseada nas atuais exigências regulamentares e do mercado.

Na Tabela V encontram-se descritas as matérias-primas utilizadas no decorrer do trabalho, bem como as respetivas funções.

Tabela V- Matérias-primas e as propriedades de cada uma.

MATÉRIAS-PRIMAS	PROPRIEDADES
Álcool cetílico	Emoliente, agente estabilizante e dador de consistência
Cera branca	Dador de consistência e brilho
Glicerina	Agente emulsionante, humectantes
Laurilsulfato de sódio	Agente tensioativo O/A
Metilparabeno	Conservante
Propilparabeno	Conservante
Óleo de coco	Hidratante, anti envelhecimento e regenerador da pele (vitamina E e vitamina K)
Óleo de macadâmia	Hidratante, anti envelhecimento e regenerador da pele (ômega 7 e ômega 9)

3.2 Métodos

Este trabalho foi subdividido em 2 fases:

- Fase I - Fase preliminar do QbD;
- Fase II - Ferramentas estatísticas aplicadas ao desenho de experiências (DoE);

Os métodos adotados no presente trabalho foram subdivididos em quatro segmentos: (i) metodologia para análise de risco, (ii) ferramentas estatísticas aplicadas, (iii) metodologia de preparação das formulações e (iv) métodos de caracterização das formulações. Os métodos utilizados em cada segmento serão descritos seguidamente.

3.2.1 Determinação QTPP e CQAs

O perfil de qualidade do produto (QTPP) é a primeira etapa do desenvolvimento de um produto baseado no conceito QbD. A criação do QTPP foi realizada na fase preliminar do QbD, a qual incluiu a definição do perfil do produto objeto do desenvolvimento, a dosagem, a via de administração, o aspeto, a consistência, o perfil de libertação, a viscosidade, entre outros.

Para a elaboração do QTPP utilizou-se uma Tabela contemplando as características de qualidade do produto que se desejava alcançar na fase final do desenvolvimento e processo de fabrico, considerando a segurança e eficácia do mesmo.

Após o procedimento descrito acima, realizou-se a segunda etapa que consistiu na identificação dos parâmetros críticos de qualidade (CQAs), em que foram descritos os

atributos que deveriam ser investigados, controlados e garantidos durante todo o processo de desenvolvimento e produção.

Na determinação dos CQAs recorreu-se a uma listagem contemplando os parâmetros identificados de acordo com a criticidade, baseado principalmente na gravidade do dano ao consumidor, além de uma justificação.

Para a determinação do QTPP e CQAs recorreu-se a informações obtidas através de conhecimento prévio, dados experimentais, literatura científica, legislação e farmacopeias disponíveis.

3.2.2 Metodologia para a avaliação do risco

Foi executada uma avaliação inicial do risco antes do desenvolvimento do produto, com o intuito de identificar e classificar as possíveis variações envolvidas no processo, o grau de criticidade destas variações e os possíveis impactos na qualidade do produto, a fim de atender o QTPP desejado.

A execução da análise do risco inicial foi baseada no conhecimento prévio do produto, dados experimentais iniciais, informações obtidas através da determinação do QTPP, dos CQAs, dos CMAs e dos CPPs.

Desta forma, realizou-se inicialmente a identificação dos atributos do material e dos parâmetros de processo que poderiam ter impacto nos CQAs do produto e assim gerar alguma falha na qualidade do mesmo, a fim de determinar quais deveriam ser investigados e controlados.

Para efetuar a análise do risco recorreu-se ao diagrama de Ishikawa, também conhecido como diagrama Espinha-de-Peixe. Este diagrama retrata uma relação de causa-efeito entre as variáveis que poderão afetar os CQAs. A estrutura deste diagrama conta com uma linha horizontal, em que o final da linha representa o produto que se procura obter. As linhas diagonais representam os principais fatores de influência. Por fim, as sub-linhas nas linhas diagonais são categorizadas pela influência dos parâmetros críticos do processo e dos atributos críticos do material. O diagrama foi dividido nas seguintes categorias: ambiente, pessoal, matérias-primas, processo de fabrico, métodos e equipamentos, sendo projetado através da aplicação draw.io (Versão: v12.6.5, JGraph Ltd). Além disso, foi também elaborada uma matriz do risco, utilizando os principais fatores observados no diagrama, com o intuito de estimar o grau de criticidade dos atributos dos materiais e os parâmetros dos processos que poderiam influenciar nos CQAs identificados do produto.

Para a elaboração da matriz do risco, foi contruída a correlação entre os CQAs e os atributos de materiais e parâmetros de processo, sendo os riscos avaliados e classificados individualmente, considerando a probabilidade de ocorrência e o impacto. Utilizou-se uma combinação de valores numa escala de 1 a 5, representando 5 um risco muito alto, 4 um risco alto, 3 um risco médio, 2 um risco baixo e 1 um risco muito baixo. Os valores foram calculados e resultaram numa classificação do risco com prioridade ALTO, MÉDIO e BAIXO, no qual o alto é sinalizado pela cor vermelha, o médio a cor amarela e o baixo a cor verde (99,100).

Baseado nos resultados obtidos da matriz do risco, foi projetado um gráfico de Pareto com o objetivo de demonstrar quais os atributos de material e parâmetros de processo que são críticos e necessitam de ser investigados experimentalmente e controlados durante o decorrer do desenvolvimento do produto, a fim de garantir o QTPP do produto. Para a construção deste gráfico foi preparada uma Tabela contendo a listagem dos CQAs e dos CPPs sinalizados na matriz do risco. Efetuou-se uma soma desses valores e foram categorizados por ordem decrescente, determinando-se o valor total. De seguida, foi calculado o percentual de cada ocorrência, de acordo com o valor total e o percentual acumulado das ocorrências atingindo a 100% e, por fim, foi obtido o resultado no gráfico.

Para a elaboração da matriz de risco e do gráfico de Pareto recorreu-se ao programa informático Microsoft Office Excel® versão 16.40 (20081201).

3.2.3 Desenho de experiências (DoE)

Para o desenho de experiências utilizou-se o plano Box-Benhken como modelo de otimização e a metodologia de superfície resposta. Foram utilizados três fatores e três níveis, com o intuito de construir modelos polinomiais de segundo grau e desenho de uma superfície de resposta quadrática, permitindo assim utilizar um menor número de experiências no processo de otimização.

Um total de 17 experiências foram projetadas pelo programa informático *Design Expert* (versão 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA). Foram especificadas três variáveis independentes da formulação, nomeadamente a quantidade de laurilsulfato de sódio (%) (X1), cera branca (%) (X2) e óleo de macadâmia (%) (X3). Estas três variáveis da formulação variaram em três níveis: baixo (-1), médio (0) e alto (+1), selecionados com base na triagem preliminar das variáveis. Foram estudadas três variáveis dependentes, respetivamente pH (Y1), viscosidade (Y2) e adesividade (Y3). As variáveis do plano mencionadas para o desenvolvimento da formulação do produto deste trabalho estão apresentadas na Tabela VI. A matriz de planeamento da experiência criada pelo programa

estatístico encontra-se ilustrada na Tabela VII. As 17 formulações foram preparadas e todas as respostas obtidas foram analisadas e registradas.

Tabela VI - Variáveis usadas no plano Box-Behnken.

Variáveis independentes (fatores)	Níveis		
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
X_1 : Laurilsulfato de sódio (%)	0,5	1	1,5
X_2 : Cera branca (%)	2	3,5	5
X_3 : Óleo de macadâmia (%)	6	8	10

Tabela VII - Matriz de planejamento das experiências obtidos no plano Box–Behnken.

Experiência	Variáveis independentes (fatores)		
	X_1 : Agente tensioativo (%)	X_2 : Cera branca (%)	X_3 : Óleo de macadâmia (%)
1	1,5	5	8
2	1,5	3,5	10
3	1	3,5	8
4	1	3,5	8
5	0,5	5	8
6	1,5	3,5	6
7	0,5	3,5	6
8	0,5	3,5	10
9	1,5	2	8
10	1	3,5	8
11	1	5	10
12	1	5	6
13	1	2	6
14	1	3,5	8
15	0,5	2	8
16	1	3,5	8
17	1	2	10

3.2.4 Método de preparação dos cremes hidrófilos

Neste trabalho foi preparado um creme hidrófilo. O método empregue consistiu na preparação de creme sem a prévia separação de fases. Este método não é o método mais habitual na literatura. Desta forma, durante a etapa preliminar de estudo, realizou-se a preparação de 3 lotes da formulação base, tendo como objetivo abranger o conhecimento relacionado com a formulação, realizar uma investigação quanto ao seu comportamento e avaliar a estabilidade física do produto.

Inicialmente, procedeu-se à pesagem das matérias-primas (Tabela V) e as mesmas foram misturadas manualmente num copo graduado; de seguida, a mistura foi aquecida em banho termostatado à temperatura de 70-80°C até completa fusão dos constituintes (Figura 13(a)). Posteriormente, procedeu-se à agitação com placa de aquecimento durante 5 minutos a 700 – 1000 rpm (Figura 13(b)). Após remoção da preparação do aquecimento, promoveu-se o arrefecimento com agitação durante 25 minutos, para homogeneização completa. Por fim, a preparação foi arrefecida completamente à temperatura ambiente, acondicionada em boiões de vidro e armazenada em estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

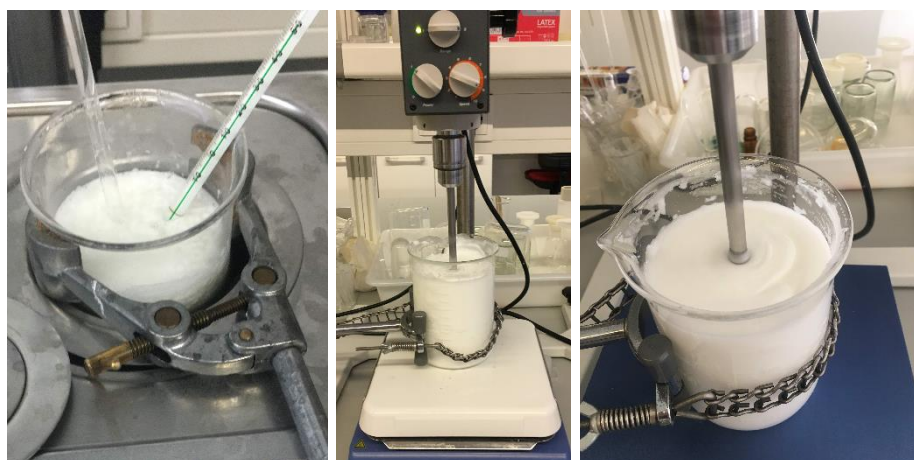


Figura 13 – a) Aquecimento da formulação em banho termostatado, b) Agitação da formulação com agitador em hélice e placa de aquecimento e c) Arrefecimento com agitação.

A partir da formulação inicial (Formulação base) apresentada na Tabela VIII obtiveram-se as 17 formulações propostas no desenho experimental. Cada formulação utilizou os parâmetros de processo, conforme descrição na Tabela IX.

Tabela VIII - Fórmula base do creme hidrófilo.

Matérias-primas	Quantidade (g)	
	Para 100g	Para 200g
Álcool cetílico	9,0	18,0
Cera branca	3,0	6,0
Glicerina	8,0	16,0
Laurilsulfato de sódio	1,0	2,0
Metilparabeno	0,1	0,2
Propilparabeno	0,2	0,4
Óleo de coco	3,0	6,0
Óleo de macadâmia	8,0	16,0
Água purificada	67,7	135,4

Tabela IX – Parâmetros do processo

Variável do processo	Valor mínimo	Valor máximo
Tempo de aquecimento (min)	30 min	80 min
Temperatura do aquecimento (°C)	70 °C	80 °C
Tempo de agitação (min)	30 min	35 min
Velocidade de agitação (rpm)	700 rpm	1000 rpm
Temperatura do aquecimento em agitação (°C)	100 °C	100 °C

3.2.4.1 Incorporação do extrato

Para a incorporação do extrato na formulação, foi repetido o método de preparação do creme hidrófilo, conforme descrito no item 3.2.4, tendo-se substituído a água purificada pelo extrato de cascas de *C. sativa*. As quantidades utilizadas nesta formulação foram as apresentadas na formulação “ótima” obtida na etapa final do desenho experimental (Tabela X).

Tabela X – Formulação do creme com extrato de casca de C.sativa

Matérias-primas	Quantidade para 100 g
Álcool cetílico	9,0
Cera branca	5,0
Glicerina	8,0
Laurilsulfato de sódio	0,93
Metilparabeno	0,1
Propilparabeno	0,2
Óleo de coco	3,0
Óleo de macadâmia	10,0
Extrato de casca de <i>C.sativa</i>	63,77

3.2.5 Métodos de caracterização das formulações

Logo após a preparação das formulações na fase experimental, os lotes contendo 200 g do produto final foram acondicionados em boiões de vidro e armazenados em estufa a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, até à realização dos ensaios de controlo da qualidade.

Cabe esclarecer que, na etapa preliminar, foram preparados lotes contendo 400 g da formulação base e os mesmos foram acondicionados em embalagens do tipo boião de vidro e armazenados em estufa a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de 60 dias, com o intuito de investigar e conhecer de forma aprofundada a formulação.

Para a caracterização da formulação optou-se por realizar a análise organolética, ensaios para caracterização reológica, análise do tamanho de gotícula, determinação do pH, determinação da cor e análise da textura do produto.

3.2.5.1 Análise organoléptica

A caracterização das propriedades organoléticas foi feita utilizando os sentidos do tato, visão e olfato. O consumidor, ao aplicar um creme na pele, sujeita-o a uma análise involuntária quanto às características do produto. O tato é o sentido que avalia a sensação do mesmo na pele. A visão é responsável pela primeira impressão do produto, ao observá-lo na embalagem. Por fim, o olfato é responsável por avaliar o odor quando os compostos voláteis de um determinado produto causam uma sensibilização no sistema olfativo do indivíduo (88). A análise das características organoléticas é um estudo sugestivo, de fácil acessibilidade para a avaliação da qualidade do produto, pois é possível avaliar o estado

físico do mesmo, o aspeto, detetar possíveis alterações como alterações no odor e na cor, avaliando de um modo geral a qualidade do produto (89). Estas análises foram realizadas na fase preliminar e na fase experimental, sendo avaliada a cor, o aspeto e o odor. Ressalta-se ainda que, na fase preliminar, a análise foi realizada ao longo do tempo.

3.2.5.2 Avaliação do pH

A determinação do pH de uma preparação semissólida é um ensaio de extrema relevância, uma vez que este deve apresentar compatibilidade com a região da pele onde vai ser aplicado. Além disso, o pH tem influência na solubilidade do produto, na estabilidade física e na probabilidade de causar irritação cutânea.

O pH é definido como a concentração dos iões de hidrogénio numa solução aquosa. A determinação potenciométrica do pH é realizada através da avaliação da diferença de potencial entre 2 elétrodos imersos numa solução. Um dos elétrodos é sensível aos iões de hidrogénio e o outro é um eléctrodo de referência (90).

A análise do pH das formulações foi determinada à temperatura ambiente, utilizando o equipamento pHmetro Basic 20 pH – Crison (Figura 14). O medidor de pH foi calibrado utilizando soluções tampão padrão de pH 4,01, 7,01 e 9,00. A análise foi realizada diluindo cerca de 1,0 g do creme em 9,0 g de água neutra. A amostra foi agitada vigorosamente e de imediato procedeu-se à leitura do valor do pH no equipamento. A determinação foi realizada em triplicado, 2 dias após a produção do lote. É importante ressaltar que na fase preliminar do estudo a leitura do valor do pH foi realizada ao longo do tempo.



Figura 14 - Medidor de pH, pHmetro Basic 20 pH.

3.2.5.3 Ensaios reológicos

As propriedades reológicas de um produto semissólido são parâmetros fundamentais no desenvolvimento de um produto de aplicação tópica, uma vez que estas características influenciam a aceitação do produto, a sua estabilidade física (capacidade de armazenamento), o comportamento no local de aplicação e as características sensoriais, entre outras (91).

A reologia é definida como o ramo da física que estuda como se deformam e fluem os materiais quando são submetidos a uma tensão. A consistência e a viscosidade são termos envolvidos na avaliação do comportamento reológico de um produto semissólido. A consistência foi definida por Barnes e *col.* como a capacidade de um material resistir à deformação da sua forma (92). Esta característica está diretamente relacionada com a facilidade com que o produto é aplicado na pele e espalhado, bem como com a facilidade com que é retirado do material em que está acondicionado (89,92). Já a viscosidade representa a resistência desse produto ao escoamento quando submetido a uma certa tensão. A viscosidade de um material poderá ser afetada por diversas variáveis, como por exemplo a razão de deformação, a temperatura, a pressão e o tempo (89,93). Trata-se de um parâmetro crítico para produtos líquidos e principalmente semissólidos (93,94).

Ao estudar as propriedades e os comportamentos reológicos é aplicada a lei de Newton, que considera que viscosidade (η , Pa.s) é o coeficiente de proporcionalidade entre a tensão de corte (τ , Pa) e a razão de corte ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) aplicadas sobre um material, conforme descrito na seguinte Equação (92):

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Equação 5}$$

Quanto à classificação reológica dos fluidos, estes podem ser divididos em fluidos Newtonianos e não-Newtonianos. Nos fluidos Newtonianos a viscosidade não é alterada com a razão e tensão de corte, ou seja, a tensão e a razão de corte possuem uma relação linear, como é o caso da água, etanol, benzeno, éter etílico, hidrocarbonetos simples, gases e líquidos não poliméricos e homogêneos. Já os fluidos não-Newtonianos são aqueles em que a viscosidade sofre alterações de acordo com a razão e a tensão de corte aplicada, pelo que nesse sistema a viscosidade não é constante (93,95). Os fluidos do tipo não-Newtonianos podem ser classificados em (I) plásticos, (II) pseudoplásticos, (III) tixotrópicos e (IV) dilatantes (89).

Os ensaios reológicos têm como objetivo analisar o comportamento dos fluidos quando submetidos a uma determinada tensão. No caso dos produtos semissólidos, têm

por intuito avaliar a força aplicada quando se espalha um produto na pele. Além disso, é através deste tipo de ensaios que é possível caracterizar a viscosidade, avaliar as propriedades do fluxo, os fatores de influência e o seu efeito na eficácia terapêutica das formulações (93)

No presente trabalho para a realização dos estudos relacionados com o comportamento reológico das formulações utilizou-se um reômetro rotacional, Malvern Kinexus, lab + (Figura 15), com geometria tipo prato-prato (PU20SR4367SSS), a uma temperatura de 25 °C e com um intervalo de distância entre pratos de 1 mm (Gap). Recorreu-se ainda ao programa rSpace Kinexus lab+ (Versão 1.75).



Figura 15 - Reômetro rotacional Malvern Kinexus, lab+.

Este reômetro é caracterizado por ser um equipamento de alta precisão para utilização em testes de rotina de controlo da qualidade e para investigação e desenvolvimento, permitindo realizar ensaios com resultados robustos e confiáveis (95). Este reômetro permite realizar ensaios do tipo rotacionais ou oscilatórios. Os ensaios rotacionais são executados de forma a determinar a tensão de corte em função de razão de corte. Além disso, os ensaios rotacionais determinam o torque, o qual permite que a tensão de corte seja constante (95). Por seu lado, os ensaios oscilatórios são os ideais para materiais com propriedades viscoelásticas. Neste tipo de ensaio, a amostra é submetida a movimentos oscilatórios através de um ciclo contínuo. A oscilação completa deste ciclo pode ser comparada a uma rotação de 360 ° ou 2π radiano. Além disso, a amplitude da oscilação está associada à tensão (ou tensão máxima aplicada) e à frequência (ou frequência angular). Neste tipo de ensaio é possível obter resultados dos componentes presentes em materiais viscoelásticos, como o módulo elástico (G'), o

módulo viscoso (G''), a viscosidade complexa em função da frequência angular e a viscosidade em função da razão de corte (95).

Há vários testes reológicos que podem ser realizados neste tipo de reômetros, além de diferentes tipos de geometrias que poderão ser escolhidas para realização dos ensaios, como é o caso do sistema cilindro concêntrico, o sistema cone-prato e o sistema prato-prato. O sistema cilindro concêntrico é utilizado no caso de amostras fluidas, que possuem grande escoamento. Já os sistemas do tipo cone-prato e prato-prato são escolhidos para amostras pequenas e mais viscosas (91).

Para a realização dos ensaios com o reômetro rotacional, foi inserida inicialmente no equipamento a geometria escolhida (tipo prato-prato) e de seguida foi utilizado o programa informático rSpace Kinexus lab+ para realizar um teste de calibração de altura (*Zero Gap*). Foi colocada uma pequena quantidade de amostra no prato inferior do equipamento onde, foi aplicado um torque no prato superior, promovendo uma tensão de corte sobre a amostra. Após este procedimento, foi necessário retirar o excesso de amostra (Figura 16). Em seguida, foi efetuada a escolha do tipo de ensaio que seria realizado.

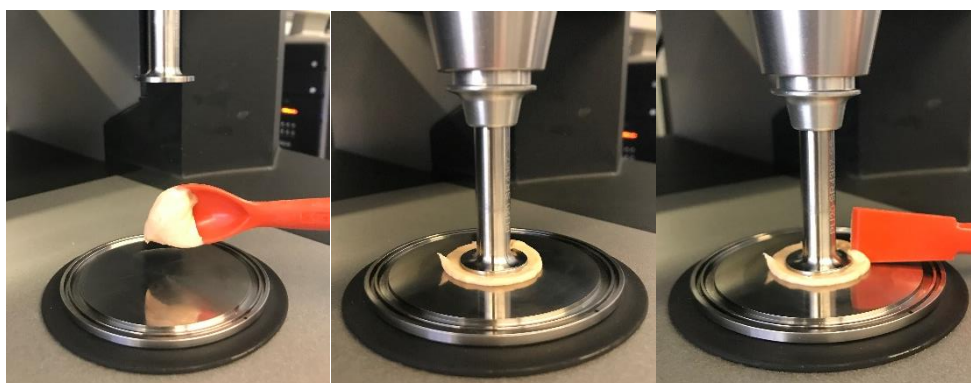


Figura 16 - a) Adição da amostra sobre o prato inferior, b) Compressão da amostra pelo prato superior e c) Retirada do excesso de amostra que extravasou.

Na fase preliminar do estudo foram realizados testes do grau de tixotropia, testes de tensão de corte em função da frequência, determinação do limite de região viscoelástica linear, testes de varrimento de frequências, efeito da temperatura e determinação da tensão de cedência, em dias determinados e em triplicado. Já na fase experimental, realizou-se apenas o teste de varrimento de frequências, 2 dias após a preparação e em triplicado. De seguida, serão apresentadas as características de todos os testes realizados nas formulações e as condições que foram consideradas para as respetivas análises das amostras.

3.2.5.3.1 Grau de tixotropia

Este termo tixotropia significa “mudança pelo toque”, provem das *palavras gregas: thixis (agitação) e trepo (mudança)* e é a designação que é dada a um comportamento reológico que apresenta uma redução da viscosidade aparente, quando submetido a uma tensão de corte, seguido por uma recuperação gradual quando a deformação é interrompida (89).

No teste de grau de tixotropia verifica-se os rearranjos microestruturais do creme, após ser submetido a diferentes razões de corte, durante um determinado tempo. Neste teste é avaliado e quantificado o grau tixotrópico usando um teste de deformação em 3 etapas:

- Primeira etapa: é empregue uma razão de deformação baixa, de forma semelhante ao comportamento de repouso;
- Segunda etapa: é aplicada uma razão de deformação alta, por um determinado tempo, com o intuito de obter uma quebra da estrutura da amostra;
- Terceira etapa: a razão de deformação é reduzida, tal como na primeira etapa, para que ocorra uma recuperação da estrutura e assim da viscosidade.

Portanto, o comportamento tixotrópico entre as amostras é verificado através da avaliação do tempo necessário para que seja recuperado 90% da viscosidade inicial, levando em consideração que quanto menor for o tempo de reconstrução, menos tixotrópica é a amostra (Figura 17).

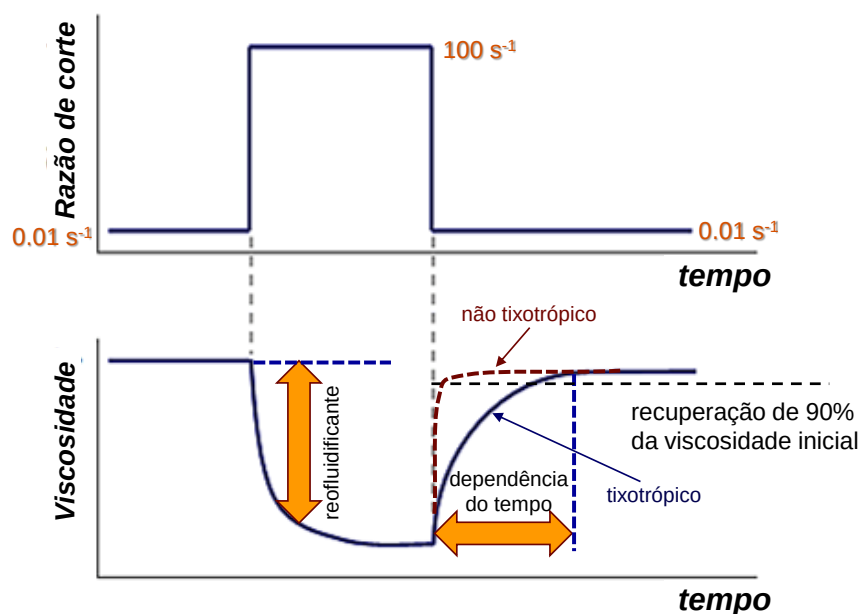


Figura 17 - Condições do teste e a resposta esperada para fluidos tixotrópicos e não tixotrópicos Adaptado de (95).

O teste do grau de tixotropia foi realizado na fase preliminar do estudo após 3 horas da preparação da formulação. Além disso, o ensaio foi realizado apenas 1 vez, pois o objetivo era apenas identificar a existência ou não de tixotropia no produto. Na Tabela XI, estão descritas as condições que foram consideradas neste ensaio.

Tabela XI - Condições do ensaio de grau de tixotropia.

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Razão de corte (s^{-1})	0,1	100	0,1
Tempo (s)	120	30	600
Intervalo (s)	10	10	10

3.2.5.3.2 Determinação da tensão de cedência

Para a determinação da tensão de cedência foi aplicada uma tensão externa sob o material no qual ocorreria a deformação elástica. Ao aumentar essa tensão externa, a estrutura do material tende a esticar-se até que se rompa e comece a fluir como se fosse um líquido. Com efeito, na avaliação é realizado um declive de tensão de cedência e a tensão é determinada quando um pico de viscosidade for observado, de modo a que valores abaixo desse pico signifiquem que a estrutura elástica do material se quebrou e

começou a escoar; caso não haja pico, o material não apresentou tensão de cedência nas condições do teste, conforme representado na Figura 18.

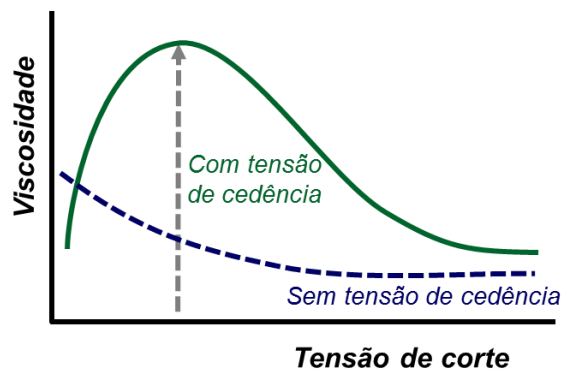


Figura 18 - Resposta de materiais com ou sem tensão de cedência Adaptado de (95).

O teste foi realizado na fase preliminar do estudo, após 3 dias de preparação da formulação e em triplicado. Na Tabela XII estão descritas as condições utilizadas neste ensaio.

Tabela XII - Condições do ensaio de determinação da tensão de cedência.

Tensão de corte inicial (Pa)	0,000
Tensão de corte final (Pa)	200,0
Tempo de rampa (min)	1,40

3.2.5.3.3 Determinação do limite de região viscoelástica linear

O teste de varrimento de amplitude é um dos métodos mais utilizados em reômetro rotacional para avaliar as propriedades viscoelásticas de um material. Trata-se de um teste do tipo oscilatório, em que a amostra é inserida no equipamento para o teste e é oscilada sobre um estado de repouso, num ciclo contínuo. Este ciclo, ao estar completo, é equivalente a uma rotação de 360° ou 2π radiano, no qual a frequência significa o número de oscilações por segundos e a amplitude representa a tensão ou tensão máxima aplicada. É através do torque aplicado no prato superior que pode ser avaliado o deslocamento angular e, assim, calcular a razão de deformação.

A medida quantitativa da rigidez do material ou resistência à deformação, denominada como módulo complexo (G^*), é fornecida através da razão entre a tensão aplicada e a deformação medida, conforme mostrado na seguinte Equação (95):

$$G^* = \frac{\sigma_{m\acute{a}x}}{\gamma_{m\acute{a}x}}$$

Equação 6

Em materiais do tipo elástico, a deformação máxima irá ocorrer aquando da tensão máxima, sendo o ângulo de fase (δ) igual a 0 (sólido ideal). Já num material caracterizado como viscoso, a tensão máxima e a deformação máxima não ocorrem ao mesmo tempo encontrando-se desfasadas com um ângulo de 90° (líquido ideal). Para um material viscoelástico, a tensão máxima e a deformação máxima ocorrem apresentam um ângulo de fase intermediário entre os materiais do tipo elástico (G') e viscoso (G''), conforme ilustrado na Figura 19.

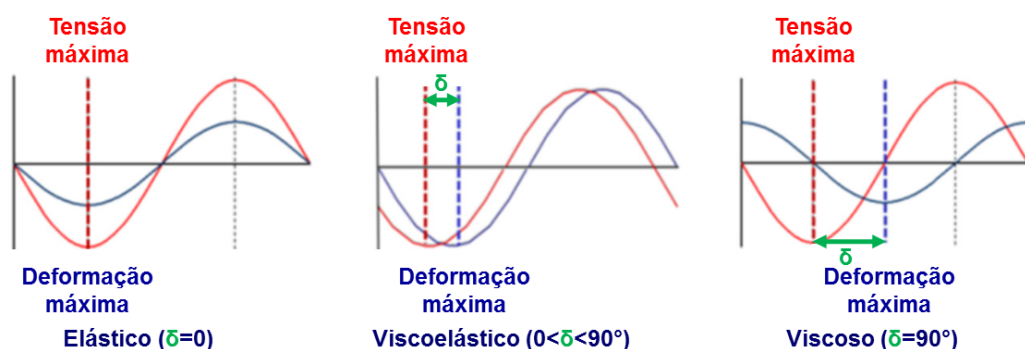


Figura 19 - Relações entre as ondas sinusoidal de tensão e deformação e diferentes valores de ângulo de fase em função do tipo de material (elástico (sólido ideal), viscoso (líquido ideal) e viscoelástico). Imagem adaptada de (95).

Para a medição das características viscoelásticas citadas acima, o teste é efetuado na região viscoelástica linear (LVER- *Linear Visco Elastic Region*) dos materiais, uma vez que é nessa região que a deformação é totalmente reversível. Entretanto, quando é aplicada uma tensão que não seja suficiente para causar uma rutura estrutural no material a ser estudado, as propriedades microestruturais serão avaliadas, mas se for aplicado uma tensão maior que a tensão de escoamento, não será possível realizar a medição das propriedades microestruturais uma vez que o material se irá romper e escoar. Assim, o limite da região viscoelástica linear é medido no ponto em que a estrutura do material se começa a romper, tendo como amplitude máxima aquela que não afeta a microestrutura do material, conforme ilustrado na Figura 20. Cabe ressaltar que essa zona de limite será fundamental para utilização no teste de varrimento de frequências.

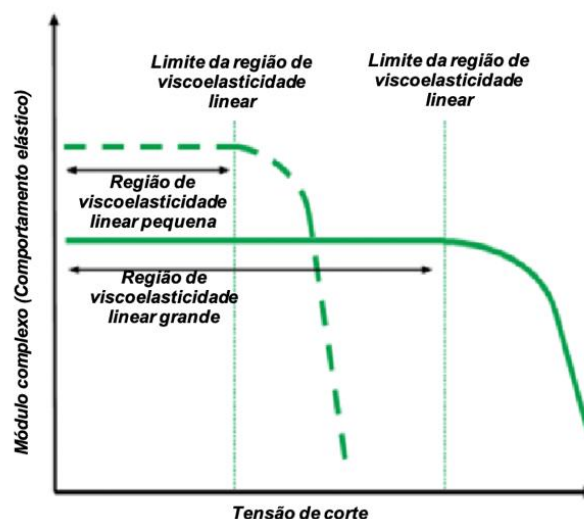


Figura 20 – Região de viscoelasticidade linear em função da tensão de corte. Imagem adaptada de (95).

O teste foi realizado na fase preliminar do estudo, após 3 dias da preparação da formulação e apenas uma vez, pois tinha o intuito de observar o limite da região viscoelástica linear. Na Tabela XIII estão descritas as condições utilizadas neste ensaio.

Tabela XIII - Condições do ensaio de determinação do limite da região viscoelástica linear.

Temperatura (°C)	25,00
Deformação de corte inicial (%)	0,01
Deformação de corte final (%)	100,00
Frequência (Hz)	1
Amostras por década	10

3.2.5.3.4 Teste de varrimento de frequência

O teste de varrimento de frequência é um ensaio oscilatório em que se classificam as propriedades viscoelásticas de um material utilizando a tensão de corte em função da frequência (Hz). Uma vez que os materiais viscoelásticos mostram dependência do tempo, neste teste avalia-se a dependência do tempo variando a frequência da tensão ou razão de deformação aplicada sob um material, correspondendo as altas frequências a uma escala de tempo curta e as baixas frequências a uma escala mais longa.

Neste ensaio é possível obter resultados quanto ao módulo elástico (armazenamento, G'), módulo viscoso (perda, G''), ângulo de fase (δ) e viscosidade complexa, em função da frequência. Desta forma, para líquidos viscoelásticos, em altas frequências, o G' é maior do que o G'' , predominando o comportamento de propriedades sólidas ($\delta < 45^\circ$); já para as frequências mais baixas ocorre o contrário, predominando o comportamento líquido ($\delta > 45^\circ$). Para um sólido viscoelástico, o módulo elástico (G') não depende da frequência, enquanto o módulo viscoso (G'') aumenta com a frequência, conforme ilustrado na Figura 21 (95).

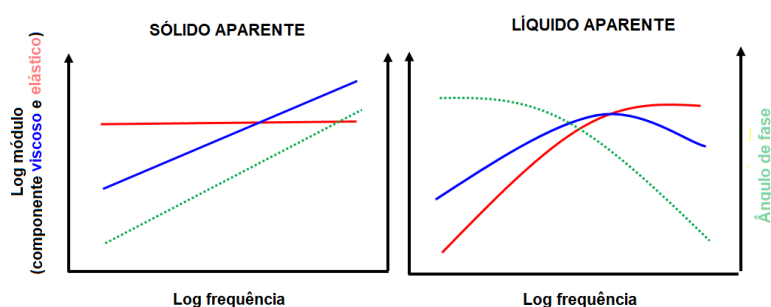


Figura 21 - Resposta típica do ensaio de varrimento de frequência para materiais do tipo viscoelástico sólido (sólido aparente) e viscoelástico líquido (líquido aparente). Imagem adaptada de (95).

Este ensaio foi realizado na fase preliminar do estudo, de forma a avaliar o módulo viscoso, elástico e o ângulo de fase, resultado fundamental para a caracterização inicial do creme. Além disso, o ensaio também foi realizado ao longo do tempo, tendo como objetivo obter informações quanto a possíveis alterações na viscosidade ao longo do tempo. Na fase experimental do produto, o ensaio foi realizado após 2 dias da preparação de cada formulação. É importante destacar que o ensaio foi repetido três vezes para cada preparação, nas condições apresentadas na Tabela XIV.

Tabela XIV - Condições do ensaio de varrimento de frequência.

Temperatura (°C)	25,00
Frequência inicial (Hz)	10,00
Frequência final (Hz)	0,100
Deformação de corte (%)	0,25
Amostras por década	10

3.2.5.3.5 Efeito da temperatura

O ensaio para determinar o efeito de temperatura teve como objetivo avaliar o comportamento do creme ao ser submetido a diferentes temperaturas (15 – 50 °C). O teste foi realizado na fase preliminar do estudo, 3 dias após a preparação da formulação, nas condições descritas na Tabela XV.

Tabela XV - Condições do ensaio de efeito da temperatura.

Temperatura inicial (°C)	15,00
Temperatura final (°C)	50,00
Rampa (°C/min)	2,000
Frequência (Hz)	1,00
Deformação de corte (%)	0,25
Intervalo (s)	5

3.2.5.4 Análise da textura

As características de textura são um dos principais parâmetros considerados pelo consumidor, relacionando-se com a qualidade do produto, uma vez que a textura é essencial para a aceitação do mesmo, seja ele um produto sólido, semissólido ou líquido.

O termo textura pode ser definido, segundo a norma ISO (1992) como “o conjunto de propriedades mecânicas, geométricas e de superfície de um produto, detetáveis pelos recetores mecânicos e tácteis e, eventualmente, pelos recetores visuais e auditivos” (96).

Numa preparação semissólida é imprescindível o ensaio de análise de textura, visto que esta é uma propriedade que está relacionada com o processo de fabrico, o manuseamento, a estabilidade e, principalmente, a aceitação do produto pelo consumidor, conforme mencionado anteriormente.

A análise de textura é um ensaio que pode ser realizado pelo tato ou através de um equipamento específico. O ensaio com recurso a um equipamento é um ensaio mecânico, o qual tem por objetivo avaliar as propriedades físicas do produto, as suas características específicas, o seu comportamento e adesividade, a sua espalhabilidade e compressibilidade, entre outras. A análise destas características físicas está associada à deformação provocada pela aplicação de uma força, sendo caracterizadas em termos de força aplicada, distância percorrida pela sonda (deformação) e tempo de aplicação.

Uma representação gráfica da força *versus* o tempo pode ser visto Figura 22, em que a força máxima ($F_{\text{máx}}$) corresponde à firmeza (força necessária para ocasionar uma deformação), a área positiva (A1) à compressibilidade (força por unidade de tempo necessária para deformar o produto) e a área negativa (A2) à adesividade do produto analisado (trabalho realizado para ultrapassar as forças atrativas entre a sonda superior e a superfície da amostra acoplada na sonda inferior).

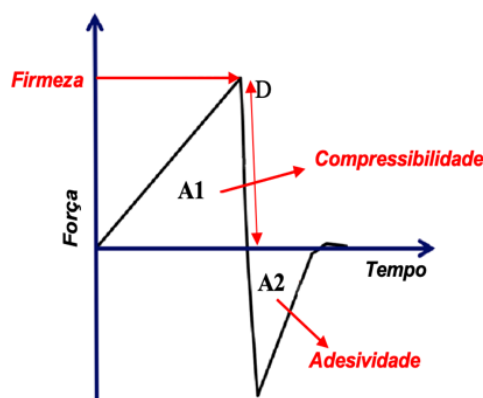


Figura 22 - Representação gráfica da força versus tempo.

Para a análise da textura foi realizado o ensaio de espalhabilidade no equipamento Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Figura 23), com recurso ao programa informático Exponent (versão 6,1,12,0).

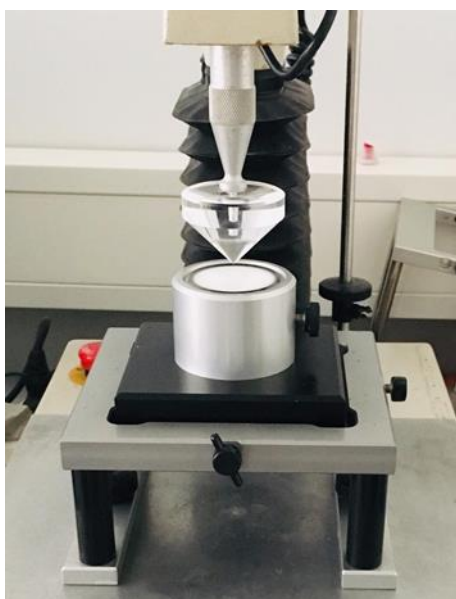


Figura 23 – Ensaio de espalhabilidade através do Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i.

Para a realização do ensaio, as amostras foram previamente inseridas no cone fêmea e mantidas em estufa a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 30 minutos antes da realização do ensaio. De seguida, a sonda adequada foi escolhida e conectada ao equipamento, determinando-se a posição inicial de 25 mm. Para a medição, a sonda superior (cone macho) penetra na amostra que está no cone fêmea a uma velocidade de 3 mm/s percorrendo uma distância de 23 mm e a seguir a sonda retorna à posição inicial, gerando o resultado. Devido ao formato da sonda neste caso estão envolvidas forças de compressão e de corte ou tangenciais.

Tabela XVI - Condições do ensaio de análise da textura.

Posição inicial da sonda (mm)	25
Distância a percorrer (mm)	23
Velocidade (mm/s)	3

Na fase preliminar do estudo, realizou-se o ensaio em três amostras para cada formulação; já na fase experimental, o ensaio foi realizado 2 dias após a preparação da formulação, igualmente em triplicado.

3.2.5.5 Tamanho da fase interna

O conhecimento do tamanho da gotícula da fase interna e da sua distribuição têm diretamente impacto na qualidade do produto final, uma vez que partículas de diferentes formas podem gerar grande impacto em algumas etapas do processo operacional, no acondicionamento do produto, na sua fluidez, na microestrutura do material, na resistência mecânica e nas propriedades térmicas e elétricas do produto final.

É importante ressaltar que o diâmetro médio não pode ser considerado como uma descrição exata do tamanho da gotícula, devendo-se analisar toda a distribuição granulométrica, uma vez que existem materiais que apresentam diâmetros médios idênticos com distribuições granulométricas diferentes. Sendo assim, os dados que geralmente são considerados são os gráficos de distribuição e frequência acumulada e incremental e os percentis.

Há diversas técnicas que podem ser utilizadas para a análise do tamanho de partículas. Entretanto, a técnica utilizada no presente trabalho é a de difração (ou espalhamento) de luz, também conhecida como técnica de difração a laser. Esta técnica mede a intensidade da luz espalhada (ângulo de difração do raio incidente) à medida que

um feixe de laser interage com as partículas (partículas maiores espalham o raio a menores ângulos e vice-versa) que são dispersas num fluido dispersante.

Para a avaliação do tamanho das gotículas utilizou-se o difratômetro laser Mastersizer 3000, com unidade de dispersão de amostras em meio líquido com volume flexível Hydro EV (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) (Figura 24).



Figura 24 - Difratômetro laser Mastersizer 3000, com unidade de dispersão de amostras em meio líquido com volume flexível Hydro EV.

Para o procedimento de análise, ligou-se o equipamento por aproximadamente 30 minutos antes de realizar o ensaio para que a temperatura fosse estabilizada. De seguida, a amostra foi preparada diluindo-se uma pequena quantidade com água num tubo de ensaio. A amostra foi inserida num copo graduado contendo o meio dispersante escolhido, aproximadamente 500 mL de água, até atingir um nível de obscuração entre 5 e 10%. Foi empregue o Modelo de Mie para a determinação da distribuição do tamanho de partícula, o qual possibilita obter o tamanho da partícula representado pelo diâmetro da esfera equivalente ao volume. As condições de ensaio para a medição do tamanho estão descritas na Tabela XVII. Foram efetuados pelo equipamento 5 leituras do tamanho de partícula de modo a obter a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Por fim, é apresentado o resultado através de um gráfico em que se apresenta a densidade em volume (%) em função do tamanho das partículas, em três valores, Dv10, Dv50 e Dv 90 (percentil 10, percentil 50 e percentil 90).

Tabela XVII - Condições do ensaio de análise do tamanho de partículas.

Material	Creme
Índice de refração da partícula	1,2
Índice de absorção da partícula	0,01
Índice de refração do dispersante	1,33
Dispersante	Água
Densidade (g/cm ³)	1
Modelo	Mie

Os ensaios foram realizados na fase preliminar ao longo do tempo e na fase experimental do estudo, após 2 dias da preparação das formulações.

3.2.5.6 Colorimetria

A cor é uma característica fundamental e de grande relevância para o desenvolvimento de um produto, visto que a avaliação da cor é o primeiro critério utilizado na aceitação do mesmo. Todavia, alterações na cor caracterizam um comprometimento quanto à qualidade do produto final, a qual poderá estar relacionada com a estabilidade física, fenómenos de oxidação, precipitação, redução, contaminação microbológica, solubilidade do produto, alterações de pH e temperatura, entre outros aspetos.

No presente trabalho realizou-se, primeiramente, uma avaliação visual quanto à cor do produto; mas posteriormente essa avaliação passou a ser efetuada com o colorímetro Minolta, modelo CR 400 juntamente com o programa SpectraMagic NX CM-S100w (versão 2.6) (Figura 25).

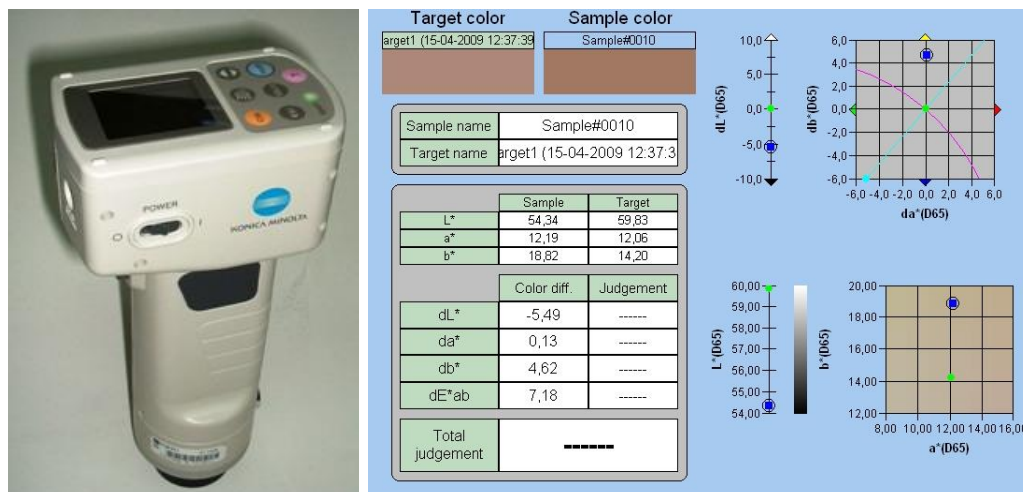


Figura 25 - Colorímetro Minolta modelo CR 400 (esquerda) e programa SpectraMagic NX (direita).

Este colorímetro é um equipamento de medição portátil de alta precisão, que avalia a cor em áreas em condições mais suaves ou com variações mínimas de cor. O equipamento possui uma fonte de luz, que produz uma radiação com diferentes ângulos de incidência, e internamente tem um sensor que recebe a luz que foi refletida verticalmente pela superfície da amostra e a caracteriza num espaço de cor de três coordenadas: L^* , a^* e b^* do sistema CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*), também conhecido como espaço de cor CIE Lab. Estes parâmetros estão relacionados com os valores de cor da percepção visual, onde o valor de a^* caracteriza coloração na região do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), o valor b^* indica coloração no intervalo do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$), e por fim, o valor L^* fornece a luminosidade, variando do branco ($L=100$) ao preto ($L=0$), conforme demonstrado na Figura 26 (97).

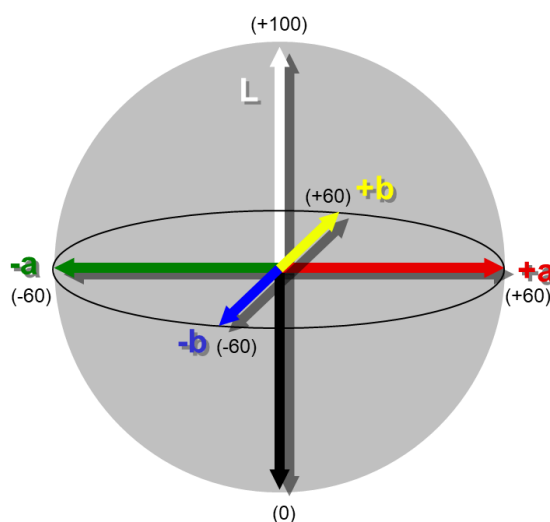


Figura 26 - Representação do espaço de cor $L^*a^*b^*$.

Para a medição da cor, o colorímetro foi previamente calibrado numa placa branca, e as análises foram realizadas em triplicado. A amostra foi inserida num vidro de relógio e de imediato realizou-se a medição apoiando o bucal do equipamento sob a amostra. A coloração foi medida com fonte de luz D 65, um iluminante que simula a luz natural do dia, e observador de 2 graus, que representa a sensibilidade do olho humano com a mistura das três cores primárias (vermelho, azul e amarelo). O resultado é gerado e pode ser verificado através do programa informático SpectraMagic NX.

Os ensaios foram realizados na fase preliminar e na fase experimental do estudo, 2 dias após a preparação de cada formulação.

3.2.5.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados recorreu-se aos programas informáticos Design Expert (versão 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA), Microsoft Office Excel® versão 16.40 (20081201), draw.io (Versão: v12.6.5, JGraph Ltd). Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas se o nível de significância associado (p) fosse inferior a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fase I- Fase preliminar do quality by design

4.1.1 Determinação do QTPP, CQAs, CMAs, CPPs e análise de risco

Segundo a norma ICH Q8, o desenvolvimento baseado no conceito QbD deve ser iniciado com a definição do perfil do produto que se deseja desenvolver e produzir. Diante disto, foi inicialmente realizada uma investigação baseada no cumprimento de aspectos regulamentares, nas expectativas da qualidade do produto, no desejo do consumidor e no conhecimento científico, constituindo-se assim o QTPP do produto.

A determinação do QTPP encontra-se disponível na Tabela XVIII, contemplando todas os elementos e as características que se espera obter para o creme com extrato de cascas de *C. sativa*, sendo possível desenvolver uma formulação robusta e reprodutível, assegurando a qualidade e a eficácia da mesma.

Os atributos físico-químicos projetados para o produto, categorizados como críticos (CQAs) foram identificados e sinalizados na Tabela XVIII, juntamente com uma justificação teórica a respeito da criticidade do atributo. Os atributos identificados como mais críticos para a qualidade do produto foram posteriormente controlados na Fase II e os atributos categorizados como não críticos não serão discutidos neste trabalho, sendo, no entanto, atributos importantes para garantir a qualidade do produto final.

Após a determinação do QTPP, identificação das CQAs, seleção dos materiais críticos (CMAs) e dos parâmetros críticos do processo (CPPs), foi delineado uma avaliação de risco inicial, que pode ser vista através do diagrama de Ishikawa (Figura 27) e da matriz do risco (Tabela XIX).

Tal como é possível verificar na Figura 27, o diagrama de Ishikawa retrata a relação que existe entre a causa e o efeito das variáveis que poderão afetar os CQAs da formulação e do processo. O resultado do diagrama permitiu obter uma imagem clara de todo processo de preparação, bem como distinguir sistematicamente os motivos que poderiam gerar uma “não conformidade” do produto e prever as condições de trabalho a serem realizadas, sendo capaz de controlar e prevenir a ocorrência de erros. Em seguida, os principais fatores mencionados na Figura 27 foram classificados numa matriz do risco, disponibilizada na Tabela XIX. Avaliando-se essa matriz do risco é possível observar, de forma visual, informação a respeito de um determinado conjunto de riscos, além da possibilidade de visualizar quais os riscos que deveriam ser priorizados.

Tabela XVIII - Determinação do QTPP e do CQA do creme com extrato de cascas de C. sativa.

QTPP	Alvo	CQAs	Justificação
Tipo de produto	Cosmético	-	-
Forma física	Creme	-	Preparações multifásicas constituídas por uma fase lipófila e por uma fase aquosa.
Via de utilização/ Administração/ Aplicação	Tópica	-	Sítio de administração do produto.
Dosagem	NA	-	-
Aspecto / Aparência	Creme liso de cor castanho contendo extrato de cascas de <i>C. sativa</i>	Sim	Alterações no aspecto/aparência do produto poderão afetar na qualidade, segurança e eficácia do mesmo. Mudanças no aspecto/aparência estão relacionadas a possíveis modificações na estabilidade físico-química e/ou microbiológica do produto. O aspecto/aparência possui influência na aceitação e adesão do paciente.
Odor	Característico	Sim	Alterações no odor do produto poderão indicar modificações físico-química e/ou microbiológica do produto. O odor possui influência na aceitação e adesão do paciente.
Cor	Castanho	Sim	A cor do produto sinaliza a presença de cascas de <i>C. sativa</i> que possui coloração castanho, além de indicar estabilidade do produto. A cor possui influência na aceitação e adesão do paciente.
Viscosidade	700 - 2.500 Pa.s	Sim	A determinação da viscosidade eventualmente é utilizada para avaliar a qualidade de um produto. Alterações na viscosidade do produto demonstra uma possível mudança na estrutura física do produto podendo interferir no tempo em que o produto irá permanecer no local de aplicação. A viscosidade é um fator crítico para avaliar a estabilidade do produto.
Identificação	Eur. Ph / USP	-	É um fator crítico para segurança e eficácia do produto.
pH	4,0 – 8,0	Sim	O pH possui influência na estabilidade físico-química do produto. O pH do produto deverá ser compatível com o pH da pele, a fim de evitar irritações e danos quanto a integridade da pele após a aplicação do produto.

Teor	Eur. Ph / USP	Sim	O teor deverá garantir que a dose estabelecida irá promover o efeito desejado. Variabilidade no teor poderá impactar na eficácia do produto.
Cristalização	Eur. Ph / USP	Sim	A cristalização possui impacto na uniformidade e estabilidade da formulação.
Tamanho da gotícula	100nm - 100µm	Sim	O tamanho de gotícula possui impacto na eficácia e na estabilidade.
Compressibilidade	20.0 - 60.0 N.mm	Sim	A compressibilidade está relacionada a consistência do produto. Alterações na consistência do produto poderá modificar as características do produto, impactando na espalhabilidade e aderência do mesmo. A compressibilidade possui influência na aceitação e adesão do paciente.
Adesividade	20.0 - 60.0 N.mm	Sim	A adesividade está relacionado a retenção do creme na pele. Possui Impacto na preservação de creme <i>in situ</i> .
Teste de Conservantes	Eur. Ph / USP	Sim	O teste de conservantes presentes no produto irá assegurar a segurança e a estabilidade da formulação.
Análise microbiológica	Eur. Ph / USP	Sim	Alterações nos limites microbiológicos poderá impactar na segurança do produto.
Estabilidade/Índice de instabilidade	ICH Q1A / Eur. Ph / USP	Sim	Alterações na estabilidade do produto poderá impactar na qualidade do produto durante o período de armazenamento. É um Requerimento de Qualidade.
Material de embalagem / Sistema fecho	Boião de vidro	-	O Material de embalagem deverá ser apropriado para acondicionar a forma física do produto.
Integridade do material	Sem falha	-	A integridade do material deverá ser mantida a fim de garantir a qualidade, eficácia e segurança.

Legenda: NA, não se aplica; Eur. Ph., Farmacopeia Europeia; USP, Farmacopeia dos Estados Unidos.

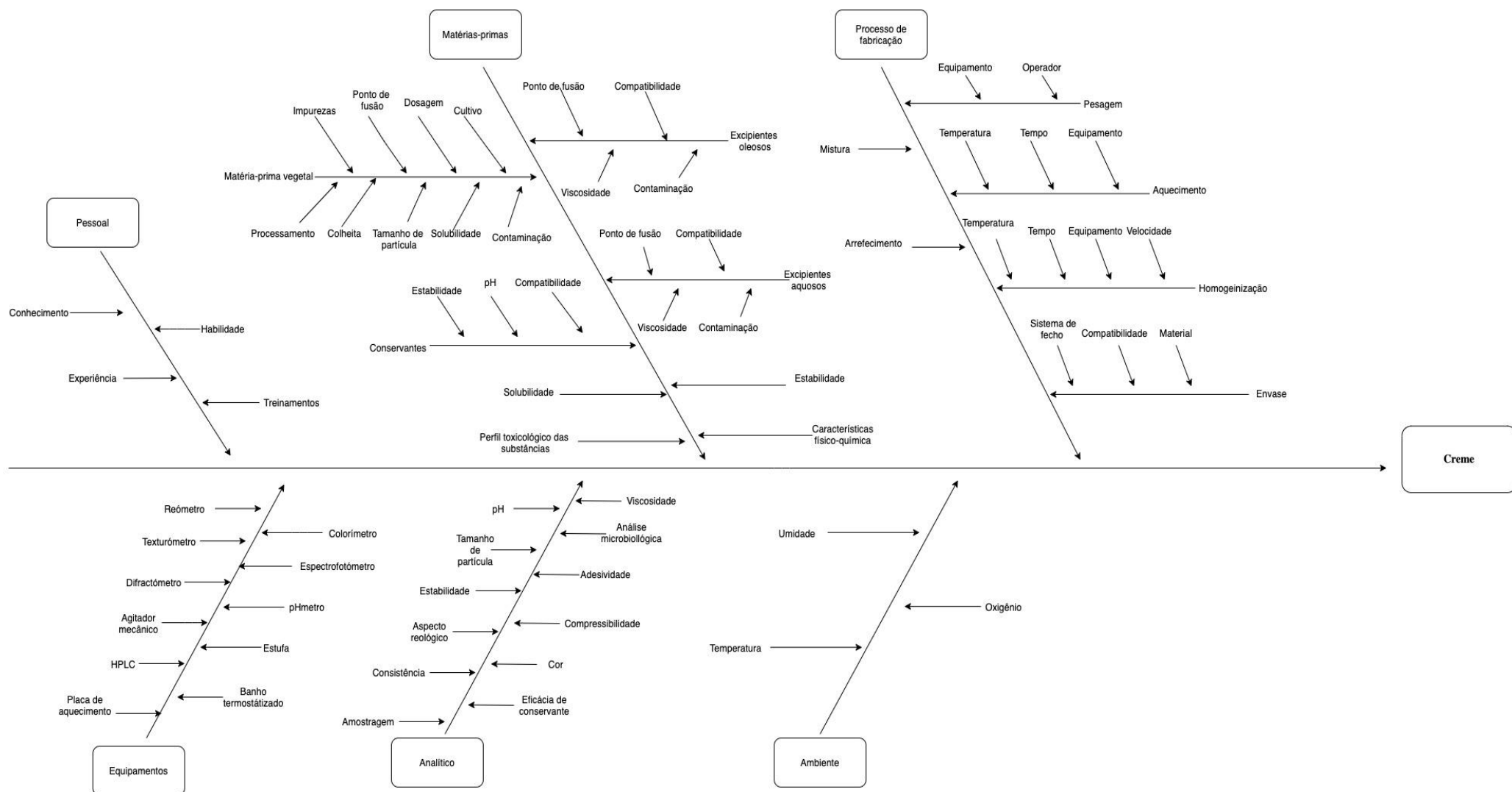


Figura 27 - Diagrama de Ishikawa resumindo as relações de causa e efeito das variáveis que afetam os CQAs no desenvolvimento do produto tópico com extrato de cascas de *C. sativa*.

Tabela XIX - Análise inicial de risco da formulação individual do produto e dos parâmetros de processo: Baixo = parâmetro de baixo risco; Médio= parâmetro de risco médio; Alto= parâmetro de alto risco.

CQAs do produto												
			Aspecto / Aparência	Odor	Cor	Viscosidade	pH	Tamanho da gotícula	Compressibilidade	Adesividade	Stress yield	Estabilidade/Índice de instabilidade
Atributos dos materiais	Excipientes oleosos	Alcool cetílico	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto
		Cera branca	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto
		Óleo de coco	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto
		Óleo de macadâmia	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto
	Agente tensioativo	Laurilsulfato de sódio	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto	Baixo	Alto
	Conservantes	Metilparabeno	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Alto
		Propilparabeno	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Alto
	Excipientes aquoso	Glicerina	Baixo	Baixo	Baixo	Médio	Baixo	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto
		Extrato de casca de <i>Castanea sativa</i>	Alto	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto
Parâmetros de processos	Mistura dos componentes		Médio	Baixo	Baixo	Médio	Baixo	Médio	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
	Tempo de aquecimento		Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Médio	Médio	Baixo	Baixo
	Temperatura do aquecimento		Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Médio	Médio	Baixo	Baixo
	Tempo de agitação		Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Médio	Médio	Baixo	Baixo
	Velocidade de agitação		Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Médio	Médio	Baixo	Baixo
	Temperatura de agitação		Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Médio	Médio	Baixo	Baixo

De um modo em geral, pela análise inicial do risco (Tabela XIX), o aspecto/aparência do produto, a viscosidade, o tamanho de gotícula, a adesividade e a compressibilidade são os CQAs altamente influenciados pelas variáveis. Tais características podem ser visualizadas de uma forma mais clara através dos gráficos de Pareto representados nas Figuras 28 e 29.

Na Figura 28, o gráfico de Pareto demonstra os níveis de gravidade, sendo possível observar que nos resultados da avaliação de risco, a viscosidade e o aspecto/aparência foram consideradas fatores altamente críticos para os CQAs. Em contrapartida, o odor e a cor são os fatores de menor criticidade. Já na Figura 29, é possível constatar que a velocidade de agitação e o tempo de agitação, obtiveram níveis de gravidade mais elevados, sendo considerados fatores altamente críticos para os CQAs. Nos gráficos de Pareto foi possível priorizar quais os atributos críticos que devem ser controlados.

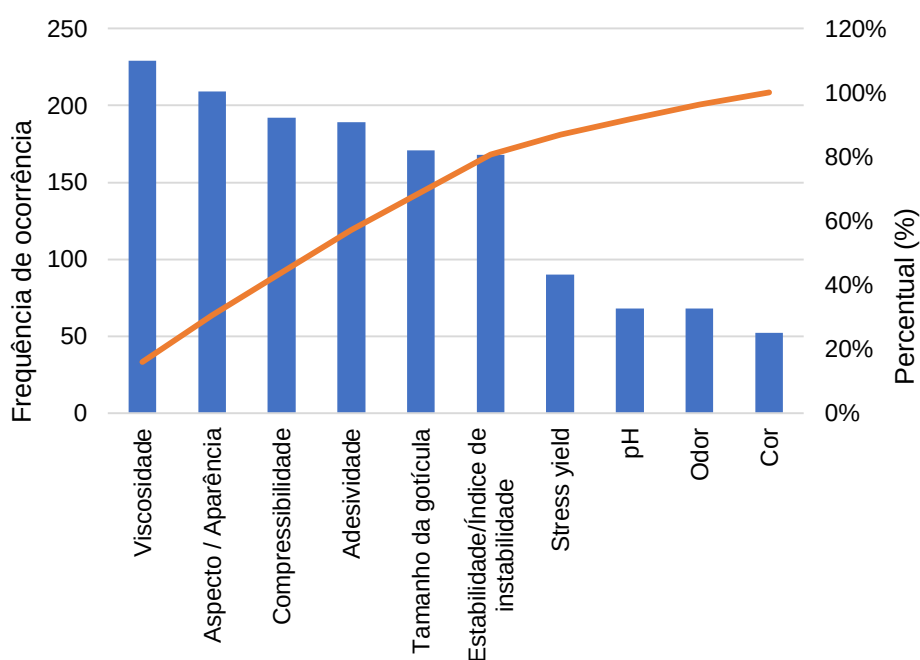


Figura 28 - Gráfico de Pareto para a triagem dos CQAS.

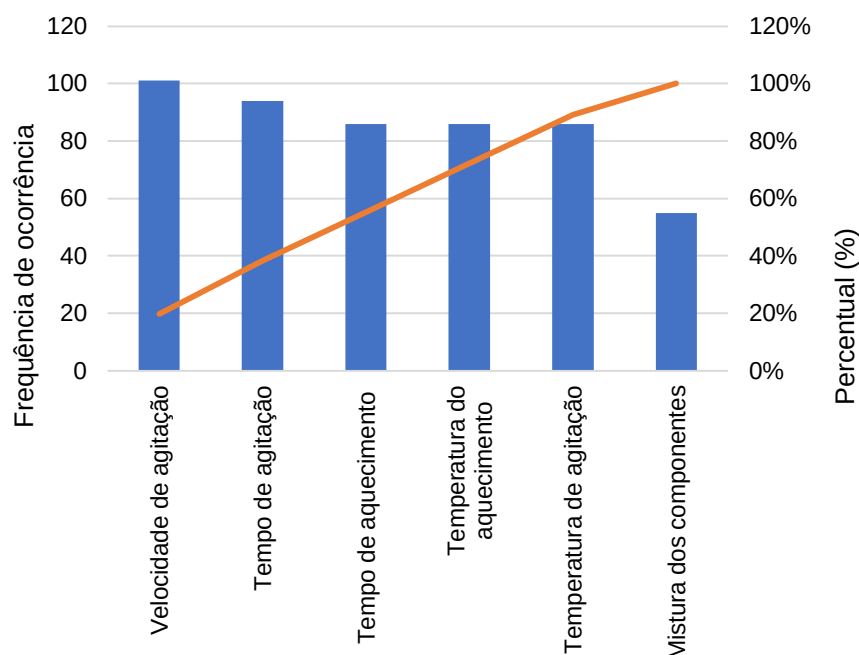


Figura 29 - Gráfico de Pareto para a triagem dos parâmetros críticos do processo.

4.1.2 Estudo de viabilidade

Para compreender os efeitos do fabrico em escala de laboratório e o comportamento do creme durante a etapa preliminar do estudo, foi realizado um estudo de viabilidade da formulação. Nesta etapa prepararam-se 3 lotes da formulação base, designados como F1, F2 e F3, tendo como objetivo investigar o comportamento da formulação e do processo de preparação. Além disso, realizou-se uma investigação quanto ao comportamento e à estabilidade física do produto, através de ensaios de análise das características organoléticas, avaliação do pH, colorimetria, análise da textura, tamanho da fase interna e ensaios reológicos (grau de tixotropia, determinação da tensão de cedência, determinação do limite de região viscoelástica linear, teste de varrimento de frequências e efeito da temperatura).

4.1.2.1 Análise organolética

Na Tabela XX são descritas as características organoléticas da formulação base preparada. A formulação foi avaliada 3 horas após a preparação e 2 dias após a preparação. Os cremes apresentaram cor branca, ausência de odor, aspeto homogêneo, sem separação de fases, tendo a consistência sido adequada. Com efeito, é possível concluir que a formulação base apresentou resultados satisfatórios para as características organoléticas.

Tabela XX - Descrição das características organoléticas das preparações da formulação base na fase preliminar.

Creme	Registro fotográfico	Cor	Aspetto	Odor
F1		Branco	Homogéneo	Inodoro
F2		Branco	Homogéneo	Inodoro
F3		Branco	Homogéneo	Inodoro

4.1.2.2 Avaliação do pH

Na Figura 30 estão apresentados os resultados de pH referentes à formulação base preparada na etapa preliminar do estudo. Assim é possível verificar que o pH não varia de modo significativo, e os valores permanecem na faixa de 7 – 8, comprovando a estabilidade ao longo do tempo.

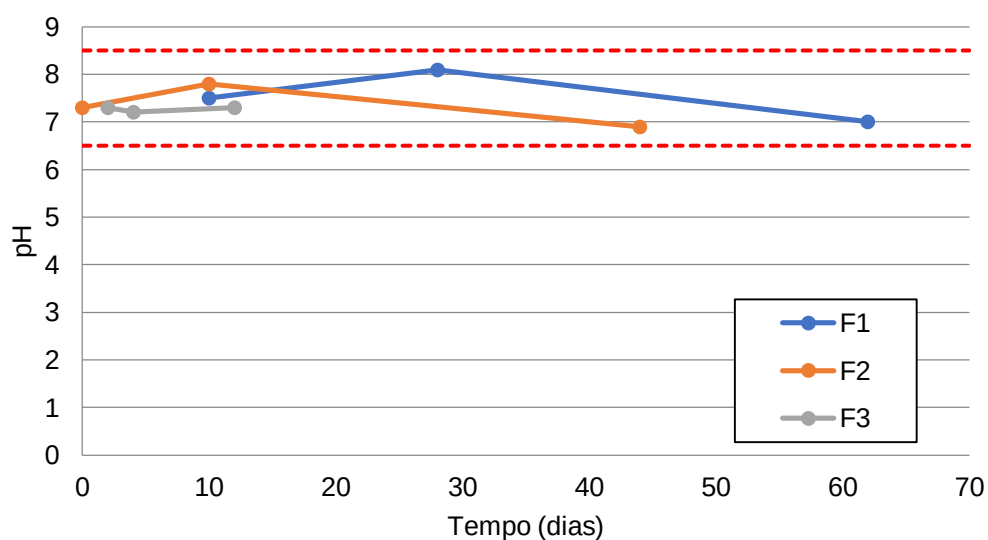


Figura 30 - Gráfico de avaliação do pH na fase de preliminar.

4.1.2.3 Análise da textura

A análise de textura foi avaliada através do teste de espalhabilidade. Esta análise realizada na etapa preliminar teve o intuito de observar o comportamento da formulação base, com ênfase na avaliação da firmeza, compressibilidade e adesividade, de modo a determinar a estabilidade física e a aceitabilidade do produto.

Nas Figuras 31, 32 e 33 estão representados os resultados correspondentes a um dos cremes, no qual verifica-se a variação da firmeza ($F_{\text{máx}}$), compressibilidade e adesividade em função do tempo, podendo observar que os valores não aumentam em função do tempo.

De acordo com os resultados da avaliação da firmeza (Figura 31) é possível constatar que a consistência do creme é reduzida e não mantém um equilíbrio ao longo do tempo. O mesmo pode ser visto para a compressibilidade (Figura 32), tal parâmetro é utilizado para verificar a força necessária para ocasionar uma deformação, quanto mais baixo os valores mais facilmente o produto é retirado da embalagem para aplicação e mais facilmente o produto é aplicado na pele.

Por fim, a adesividade (Figura 33) relaciona-se com a retenção do creme na pele, sendo caracterizada como o trabalho realizado para ultrapassar as forças atrativas entre a sonda superior e a superfície da amostra acoplada na sonda inferior. Para este parâmetro é possível observar que com o passar do tempo a adesividade se vai reduzindo.

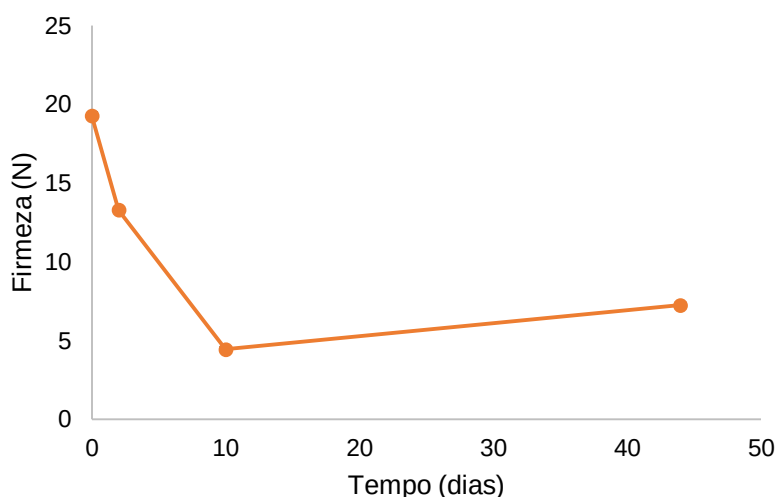


Figura 31 - Resultado da firmeza nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.

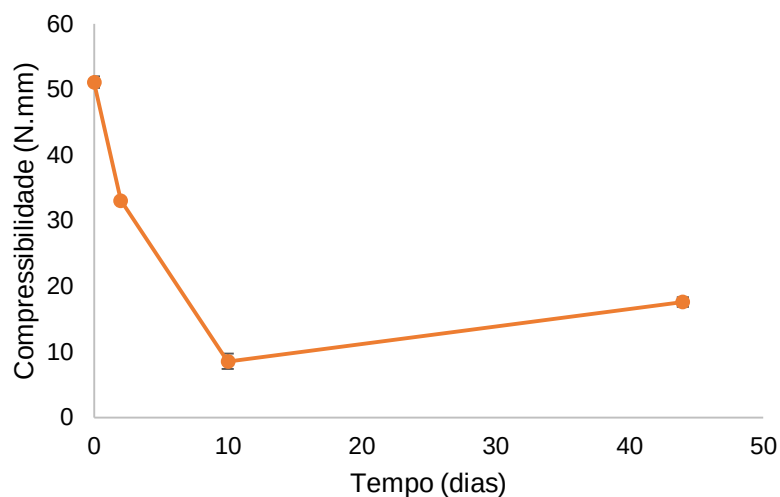


Figura 32 - Resultado de compressibilidade nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.

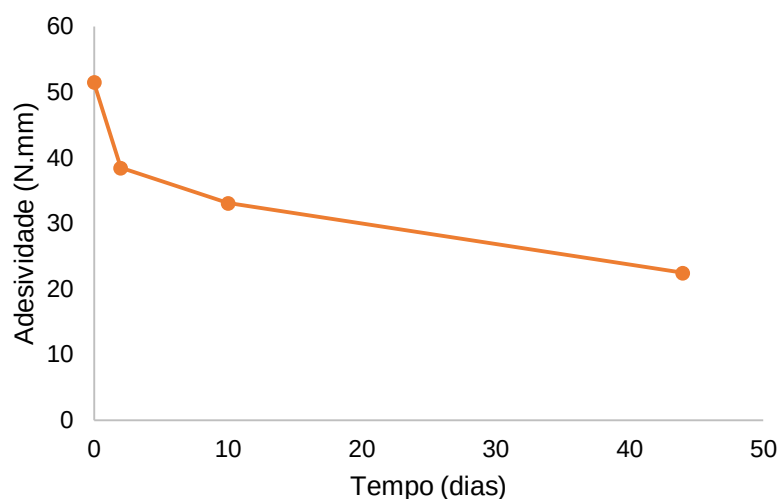


Figura 33- Resultado de adesividade nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.

4.1.2.4 Tamanho da fase interna dos cremes

Na Figura 34, é apresentado o resultado correspondente a medição do tamanho das gotículas da fase interna de um dos cremes preparado na fase preliminar. A linha de cor verde representa o Dv 90, a linha azul representa o Dv 50 e a linha amarela o Dv 10. Após a análise, verificou-se que no DV 50 e DV 90 ocorreu uma redução nos diâmetros até um determinado período de tempo e logo após um aumento no diâmetro. No Dv 10, ocorreu o efeito inverso, onde se pode observar um aumento até um determinado tempo e logo após uma redução. Estas variações parecem aleatórias e não apresentam uma tendência definida. Através dos resultados obtidos observa-se que a maior parte das gotículas (90%)

apresentaram tamanhos pequenos e desejáveis para o produto em questão, inferiores a 180 μm .

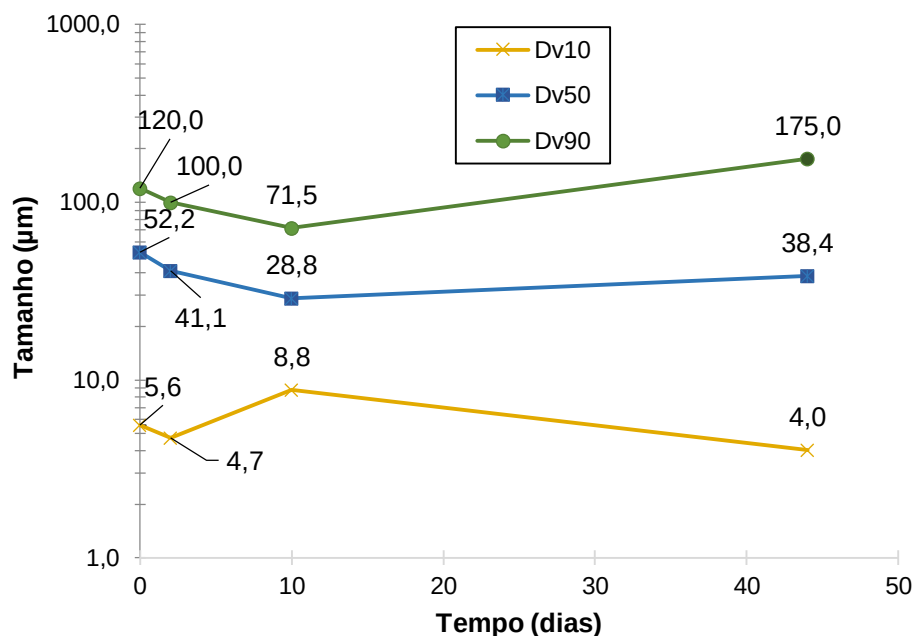


Figura 34- Resultados do diâmetro da fase interna nos tempos 0, 2, 10 e 44 dias após a preparação do creme na fase de preliminar.

4.1.2.5 Colorimetria

A análise da cor dos cremes preparados na fase preliminar do estudo teve como intuito apenas uma avaliação inicial da cor do produto objeto de estudo. Na Tabela XXI estão apresentados os valores dos resultados da avaliação (L^* , a^* e b^*) da cor. De acordo com os resultados, é possível observar que os cremes preparados nesta fase têm características semelhantes, exibindo elevada luminosidade e valores negativos para os parâmetros a^* e b^* .

Tabela XXI - Descrição da variação da cor dos cremes F1, F2 e F3 na fase preliminar do estudo.

	L^*	a^*	b^*
Creme F1	91,84	-0,77	-0,86
Creme F2	91,61	-0,80	-0,51
Creme F3	94,18	-0,72	-0,03

4.1.2.6 Ensaios reológicos

4.1.2.6.1 Tixotropia

O teste de grau de tixotropia foi realizado no tempo 0, 3 h após a preparação do creme. Na Figura 35 observa-se que a formulação base apresenta um comportamento tixotrópico, observando-se na 3ª fase uma diminuição acentuada da viscosidade, o que leva a pensar que a recomposição da estrutura irá ocorrer de forma mais lenta do que a destruição inicial. O produto em questão ao ser aplicado sobre a pele deforma-se para que o espalhamento seja fácil; quando em repouso a parte da sua viscosidade inicial é recuperada e após aplicação não escoam sobre a pele.

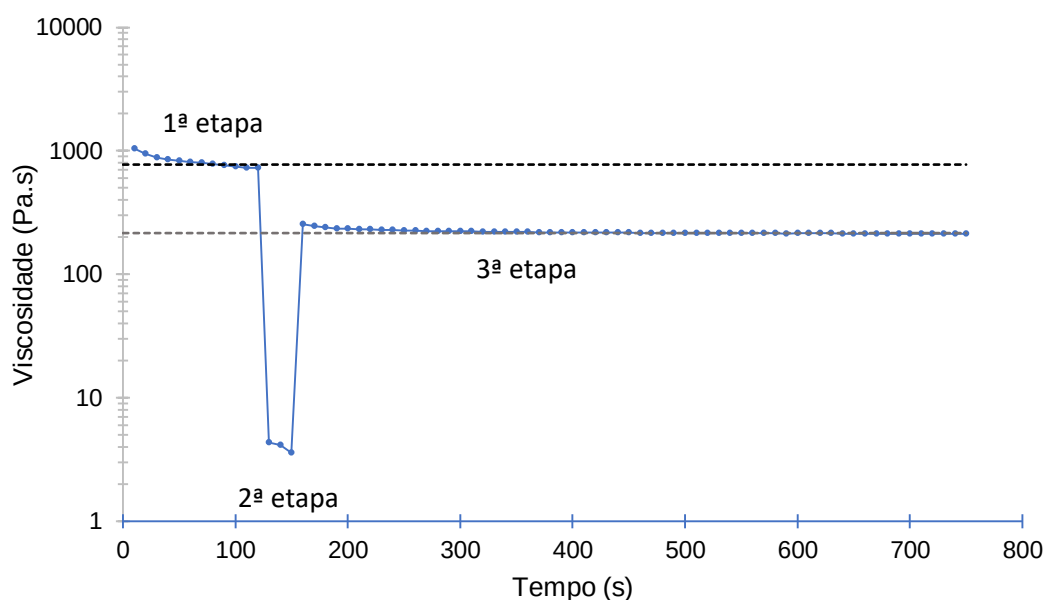


Figura 35- Gráfico da análise do grau de tixotropia do creme F1 na etapa preliminar do estudo.

4.1.2.6.2 Análise da tensão de corte em função da frequência

Inicialmente, é necessário determinar o limite da região viscoelástica linear (LVER) a ser aplicado antes da análise da tensão de corte em função da frequência. A determinação do LVER foi realizada 3 dias após a preparação da formulação base, tendo como objetivo determinar o limite a ser utilizado no teste de varrimento de frequência das restantes formulações.

Na Figura 36 (eixo da esquerda) é possível observar que o componente elástico (G') predomina sobre o comportamento viscoso (G'') durante a maior parte do ensaio, de modo que o creme se apresenta inicialmente como um viscoelástico sólido ou sólido aparente.

Além disso, pode-se observar que até ao valor de 0,79% de deformação (LVER) não ocorrem alterações nos componentes G' e G'' . Esta característica comprova que a amostra é viscoelástica. No eixo da direita podemos ver a alteração do ângulo de fase, em função da deformação (%). Perante estes dados, a fim de assegurar que a microestrutura do material não fosse afetada, o limite de deformação estabelecido para os restantes ensaios foi de 0,25%.

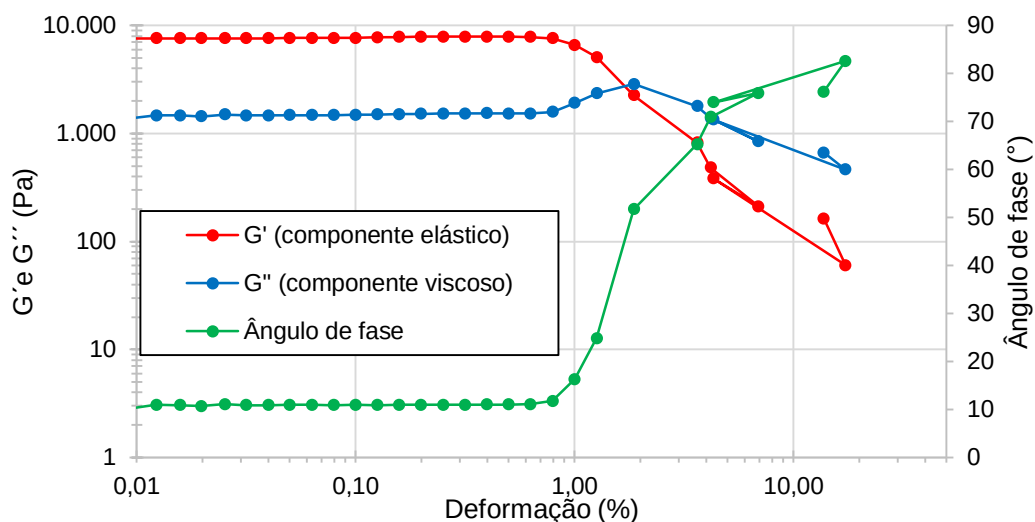


Figura 36- Determinação do LVER.

Os resultados dos ensaios de varrimento de frequência na fase preliminar do estudo encontram-se disponíveis na Figura 37.

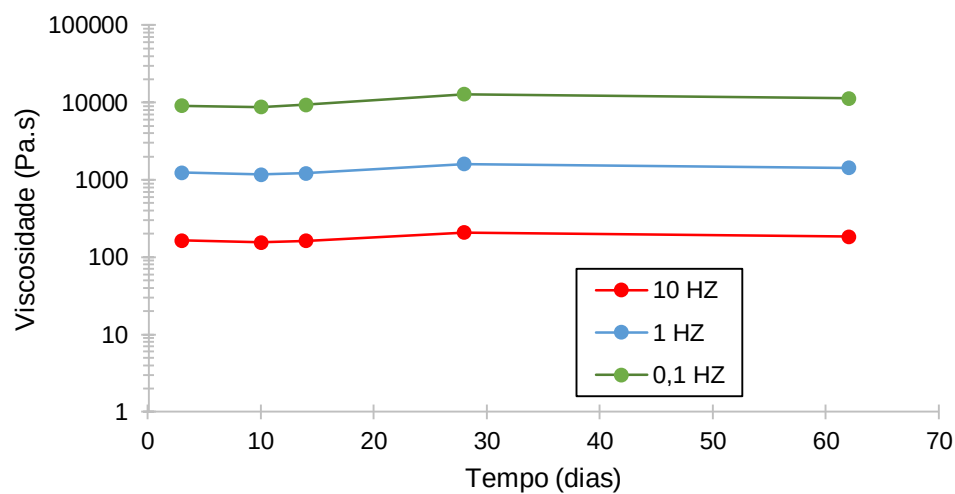


Figura 37- Gráfico da viscosidade versus tempo na fase preliminar ao longo do tempo.

Tal como é possível observar na Figura 37 que o creme leva um pequeno período de tempo para o seu amadurecimento e após esse período o creme se estabiliza. A avaliação da viscosidade ao longo do tempo é um ensaio significativo para estimar a estabilidade do produto e diante do resultado apresentado verifica-se que a formulação base demonstra ser estável ao longo do tempo.

4.1.2.6.3 Determinação da tensão de cedência

O resultado do ensaio de tensão de cedência realizado na fase preliminar do estudo, 3 dias após a preparação da formulação base, foi de 54,21 Pa. Assim para esta formulação é necessária uma tensão de corte superior a este valor para produzir escoamento do creme.

4.1.2.6.4 Efeito da temperatura

Na Figura 38 constata-se que os valores dos componentes G' e G'' diminuem à medida que a temperatura sobe de 15 °C para 50 °C, predominando sempre o componente elástico (G') sobre o comportamento viscoso (G''), apresentando-se como um sólido aparente nesta gama de temperaturas. Assim, a viscosidade do creme é mais alta quando submetida à temperatura de 15°C e praticamente constante até à temperatura de 25°C; à medida que sofre um aquecimento até 50 °C verifica-se um declínio da viscosidade.

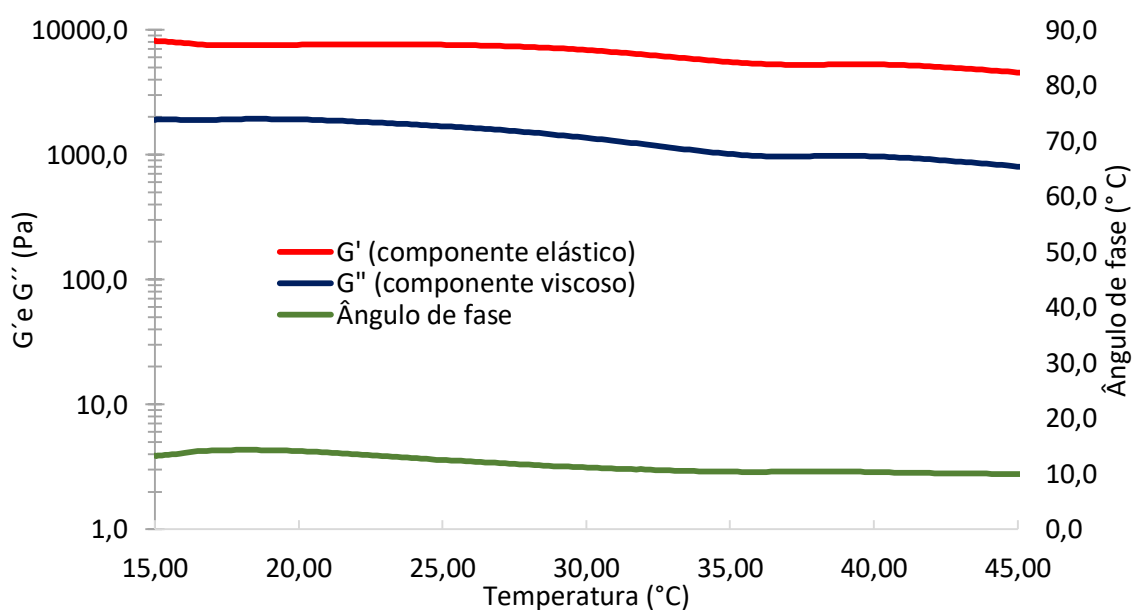


Figura 38- Resultado do ensaio de efeito de temperatura realizado na fase preliminar do estudo.

4.2 Fase II- DoE

Posteriormente ao delineamento da fase preliminar do estudo, iniciou-se a construção do desenho experimental de modo a observar e determinar as relações entre os fatores de entrada (xi - variáveis independentes) que afetam uma ou mais respostas de saída (variáveis dependentes de y). Após a preparação e caracterização das 17 formulações, nomeadas de C1 a C17, foram avaliados os parâmetros descritos nas secções seguintes.

4.2.1 Análise organolética

Na Tabela XXII estão descritas as características organoléticas das formulações desenvolvidas de acordo com o desenho experimental. As formulações foram avaliadas ao tempo 0 (3 horas após a preparação) e 2 dias após armazenadas à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os cremes apresentaram coloração branca, ausência de odor, aspeto homogéneo, não ocorrendo separação de fases.

Tabela XXII - Descrição das características organolépticas das preparações na fase de desenho experimental.

Creme	Registro fotográfico	Cor	Aspetto	Odor	Observações
C1		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C2		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C3		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C4		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C5		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases. Aspetto espumoso Espalhamento difícil
C6		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C7		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C8		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C9		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Fácil espalhamento Consistência adequada

C10		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C11		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Muito consistente
C12		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C13		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C14		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Muito consistente
C15		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Fácil espalhamento Consistência adequada
C16		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada
C17		Branco	Homogéneo	Inodoro	Sem separação de fases Bom espalhamento Consistência adequada

4.2.2 Avaliação do pH

Na Tabela XXIII estão resumidos os valores de pH referentes às formulações preparadas na etapa do DoE. As avaliações do pH para todas as formulações foram realizadas 2 dias após a preparação, tendo sido armazenados à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. De acordo com os resultados apresentados, pode-se verificar que o pH não varia, permanecendo na faixa entre 7,0 e 8,0.

Tabela XXIII - Descrição do pH das preparações da fase de DoE.

Creme	pH
C1	7,11 ± 0,09
C2	7,30 ± 0,13
C3	7,43 ± 0,13
C4	7,33 ± 0,06
C5	7,14 ± 0,03
C6	7,43 ± 0,09
C7	7,32 ± 0,04
C8	7,22 ± 0,03
C9	7,33 ± 0,01
C10	7,30 ± 0,06
C11	7,50 ± 0,01
C12	7,43 ± 0,03
C13	7,86 ± 0,03
C14	7,56 ± 0,07
C15	7,50 ± 0,03
C16	7,66 ± 0,05
C17	7,60 ± 0,01

4.2.3 Análise da textura

A análise da textura foi feita através do teste de espalhabilidade para cada formulação, avaliando a firmeza, a compressibilidade e adesividade. Entretanto, apenas o parâmetro de adesividade foi estudado como uma resposta de saída (Y3). As formulações foram avaliadas 2 dias após a preparação e armazenadas à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Nas Figuras 39 e 40 é possível constatar que o creme C11 é o que apresenta maior consistência, enquanto o C15 o que apresentou um valor mais baixo para os parâmetros de firmeza e compressibilidade. Já na Figura 41, observa-se que o creme C11 também foi o creme que apresentou maior adesividade, porém o creme C7 o que apresentou uma menor adesividade.

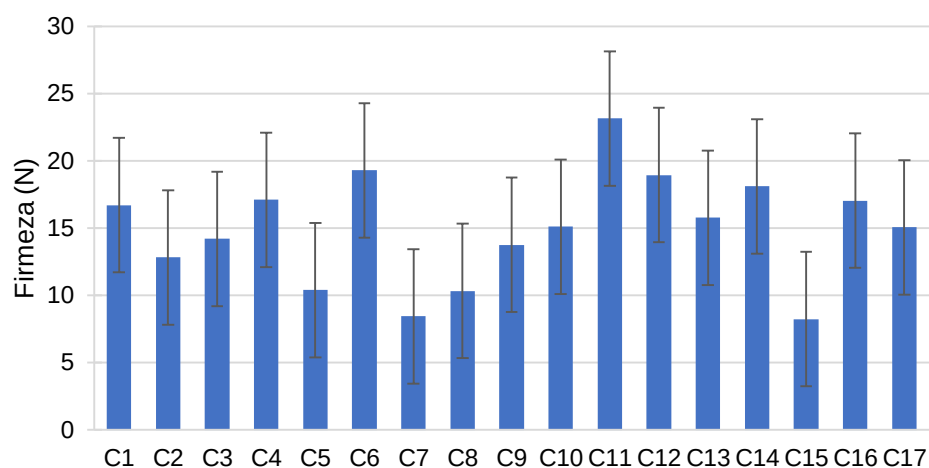


Figura 39-- Gráfico dos resultados da firmeza das formulações.

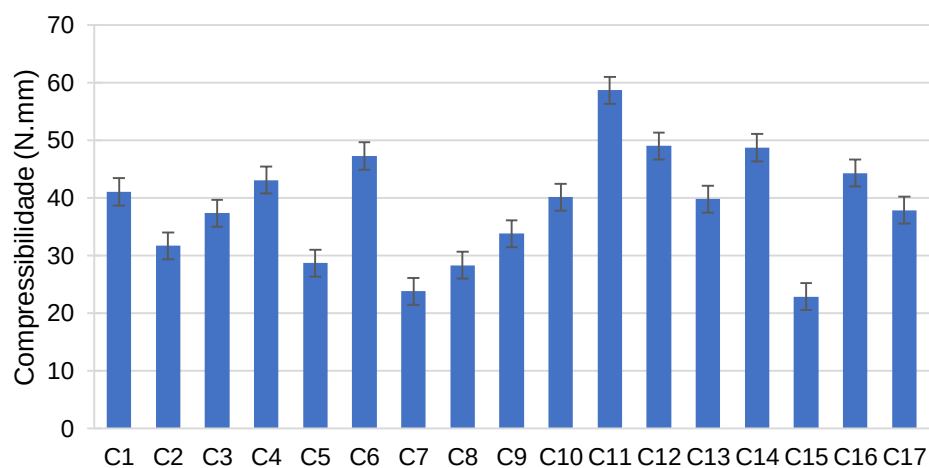


Figura 40- Gráfico dos resultados da compressibilidade das formulações.

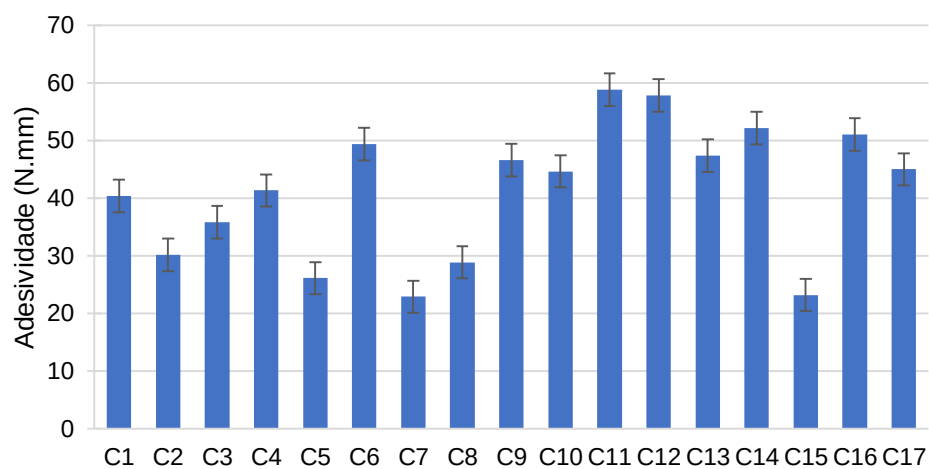


Figura 41- Gráfico dos resultados da adesividade das formulações.

A formulação C11 apresenta uma quantidade de 1% de laurilsulfato de sódio (X1), 5% de cera branca (X2) e 10% de óleo de macadâmia (X3), apresentando uma maior concentração da cera branca (dador de consistência) e de óleo de macadâmia (hidratante), podendo assim justificar o fato de apresentar maior consistência. Por seu lado, a formulação C15 apresenta 0,5% de laurilsulfato de sódio (X1), 2% de cera branca (X2) e 8% de óleo de macadâmia (X3), o que justifica a menor consistência. O creme C7 exibiu 0,5% de laurilsulfato de sódio (X1), 3,5% de cera branca (X2) e 6% de óleo de macadâmia (X3), tal formulação indica quantidades mais baixa de óleo de macadâmia e cera branca, o que pode assim justificar uma menor força a ser utilizada para remoção do produto da superfície com a qual está em contato e por sua vez, uma menor retenção do creme na pele.

4.2.4 Diâmetro da fase interna dos cremes

A Figura 42 resume os resultados da avaliação do diâmetro da fase interna das diferentes formulações. Todos os ensaios foram realizados 2 dias após a preparação e à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Após análise, verificou-se que a maior parte das gotículas (90%) apresentaram tamanhos na escala micrométrica (μm). Observa-se ainda que a formulação C5 apresentou partículas de maior diâmetro, enquanto C2 foi a que mostrou partículas de menor diâmetro.

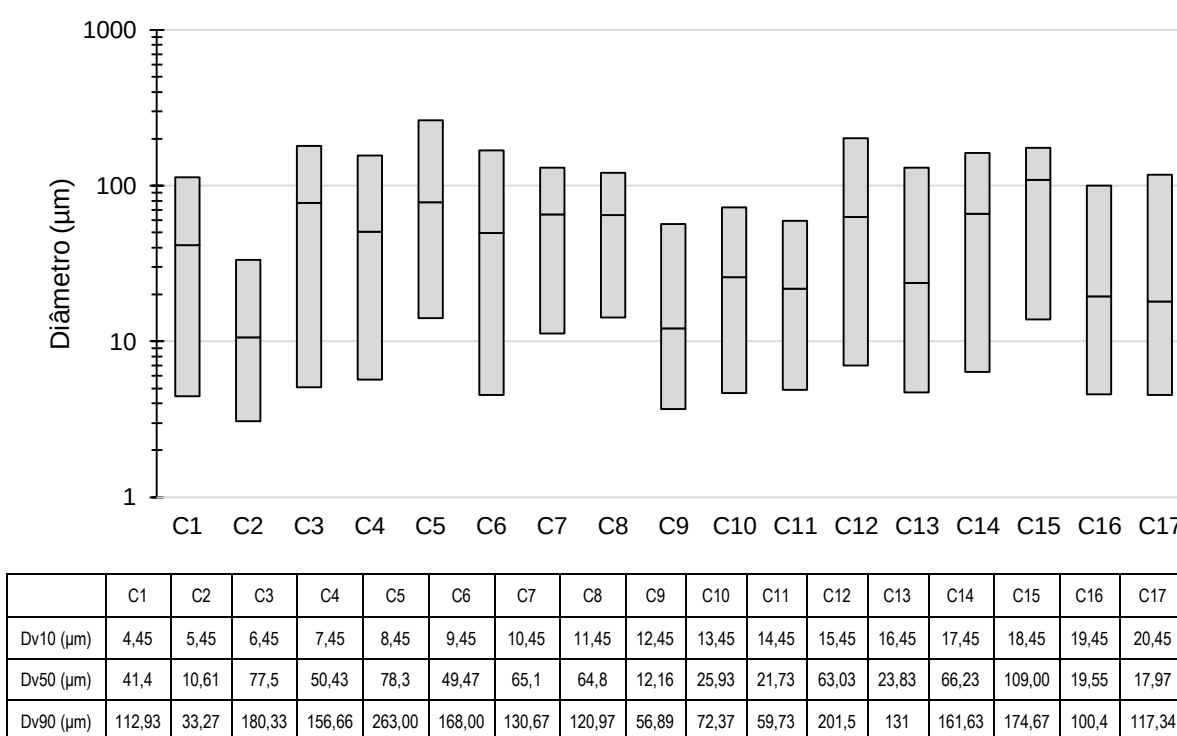


Figura 42 - Resultados do diâmetro da fase interna dos cremes na fase DoE.

4.2.5 Colorimetria

A análise da cor das formulações preparadas foi efetuada 2 dias após a preparação e armazenadas à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Na Tabela XXIV estão representados os resultados dos diferentes parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*).

Tabela XXIV – Parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*) das preparações da fase de DoE.

	L^*	a^*	b^*
C1	$92,92 \pm 1,04$	$-0,66 \pm 0,10$	$-0,74 \pm 0,35$
C2	$92,42 \pm 0,51$	$-0,83 \pm 0,08$	$-0,19 \pm 0,12$
C3	$91,12 \pm 0,81$	$-0,80 \pm 0,02$	$-0,55 \pm 0,06$
C4	$91,30 \pm 0,63$	$-0,78 \pm 0,02$	$-0,44 \pm 0,03$
C5	$93,04 \pm 0,08$	$-0,73 \pm 0,05$	$-0,19 \pm 0,11$
C6	$90,88 \pm 0,02$	$-0,98 \pm 0,01$	$-0,71 \pm 0,06$
C7	$91,70 \pm 0,31$	$-0,85 \pm 0,01$	$-0,51 \pm 0,11$
C8	$93,19 \pm 0,27$	$-0,98 \pm 0,02$	$-0,57 \pm 0,05$
C9	$91,69 \pm 0,64$	$-0,77 \pm 0,06$	$-0,59 \pm 0,12$
C10	$92,03 \pm 1,07$	$-0,44 \pm 0,03$	$-1,34 \pm 0,22$
C11	$93,59 \pm 1,76$	$-0,50 \pm 0,10$	$-0,79 \pm 0,12$
C12	$91,43 \pm 0,89$	$-0,45 \pm 0,03$	$-1,19 \pm 0,17$
C13	$91,17 \pm 0,72$	$-0,40 \pm 0,01$	$-1,88 \pm 0,29$
C14	$92,11 \pm 1,47$	$-0,41 \pm 0,04$	$-1,39 \pm 0,09$
C15	$94,41 \pm 1,03$	$-0,12 \pm 0,03$	$-0,91 \pm 0,28$
C16	$91,66 \pm 1,07$	$-0,36 \pm 0,16$	$-1,33 \pm 0,07$
C17	$91,52 \pm 0,63$	$-0,46 \pm 0,03$	$-1,60 \pm 0,13$

Conforme é possível observar, os cremes preparados apresentaram elevada luminosidade, contemplando valores entre 91,0 e 95,0 para o parâmetro L^* e valores negativos para os parâmetros a^* e b^* .

4.2.6 Viscosidade

O reograma exibido na Figura 43 relaciona a viscosidade com a frequência para as diferentes formulações preparadas na fase DoE. As análises foram realizadas 2 dias após a preparação. Pela análise do gráfico pode-se constatar que o creme C5 demonstrou possuir a maior viscosidade, enquanto o C9 tem a menor viscosidade. Comprovando assim que o creme C5 é o que apresenta uma maior resistência ao escoamento.

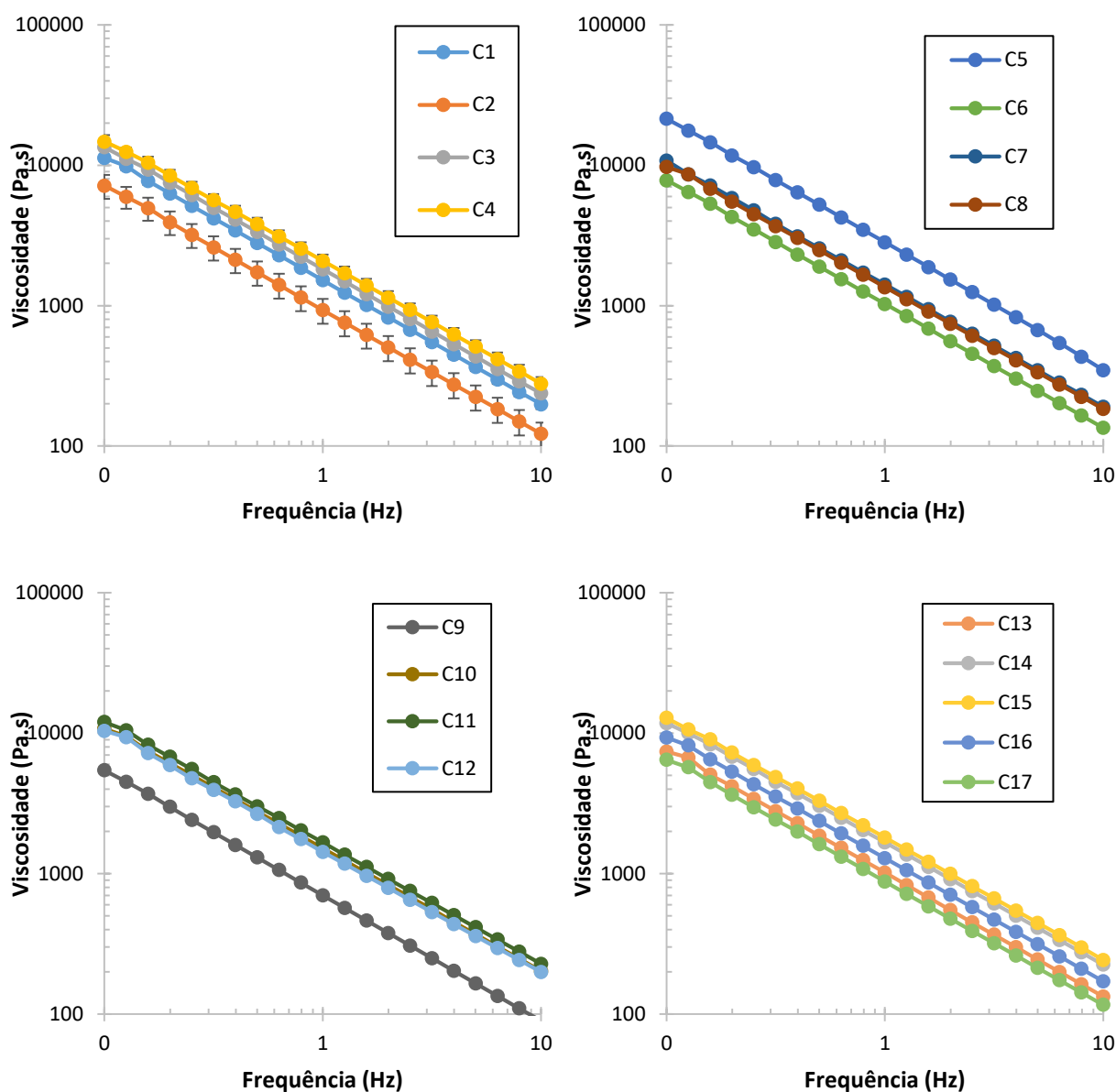


Figura 43- Gráfico da viscosidade versus frequência das formulações.

4.2.7 Desenho experimental com plano Box–Behnken

As formulações foram cuidadosamente caracterizadas para os principais atributos de qualidade e os efeitos das variáveis nas respostas foram detalhadamente estudados.

A matriz experimental das execuções aleatórias para as variáveis independentes e variáveis dependentes (respostas) observadas estão sumariadas na Tabela XXV. O intervalo de pH (Y1) para todos os lotes oscilou entre 7,11 e 7,86. Para a viscosidade (Y2), o intervalo esteve entre 700,3 e 2831,9 rpm, enquanto na adesividade (Y3) foi de 22,86 a 58,82 N.mm. Todas as respostas foram ajustadas a um modelo quadrático (segunda ordem), tendo a adequação deste modelo sido validada através de uma análise ANOVA,

teste de falta de ajuste e testes de coeficiente de correlação múltiplo, fornecidos pelo programa Design Expert.

Tabela XXV – Resultado da matriz de planejamento das experiências respostas observadas no plano Box–Behnken.

Exp.	Variáveis independentes			Variáveis dependentes		
	(Fatores)			(Respostas)		
	X ₁ : Ag. tensioativo (%)	X ₂ : Cera (%)	X ₃ : Óleo de Macadâmia (%)	Y ₁ : pH	Y ₂ : Viscosidade (Pa s)	Y ₃ : adesividade (N.mm)
C1	1,5	5	8	7,11 ± 0,09	1520,6 ± 90,45	40,39 ± 5,91
C2	1,5	3,5	10	7,30 ± 0,13	931,3 ± 187,31	30,15 ± 1,73
C3	1	3,5	8	7,43 ± 0,13	1820,8 ± 276,21	35,83 ± 6,58
C4	1	3,5	8	7,33 ± 0,06	2086,2 ± 229,12	41,30 ± 3,62
C5	0,5	5	8	7,14 ± 0,03	2831,9 ± 1951,98	26,09 ± 14,41
C6	1,5	3,5	6	7,43 ± 0,09	1029,0 ± 813,49	49,31 ± 8,54
7	0,5	3,5	6	7,32 ± 0,04	1415,9 ± 1074,74	22,86 ± 4,71
8	0,5	3,5	10	7,22 ± 0,03	1353,5 ± 1171,70	28,85 ± 9,91
9	1,5	2	8	7,33 ± 0,01	700,3 ± 585,02	46,56 ± 9,63
10	1	3,5	8	7,30 ± 0,06	1517,1 ± 1341,24	44,62 ± 0,33
11	1	5	10	7,50 ± 0,01	1667,5 ± 1465,21	58,82 ± 18,07
12	1	5	6	7,43 ± 0,03	1428,0 ± 1205,44	57,80 ± 3,67
13	1	2	6	7,86 ± 0,03	1015,6 ± 896,53	47,35 ± 1,52
14	1	3,5	8	7,56 ± 0,07	1670,7 ± 1344,08	52,13 ± 4,33
15	0,5	2	8	7,50 ± 0,03	1804,7 ± 1433,45	23,18 ± 3,38
16	1	3,5	8	7,66 ± 0,05	1288,0 ± 1117,73	50,98 ± 3,38
17	1	2	10	7,60 ± 0,01	877,7 ± 709,41	44,97 ± 7,80

Na Tabela XXVI são apresentados os resultados da análise de variância, bem como o valor F e o valor p.

As variáveis X2 e X1.X1 apresentaram efeitos significativo na resposta Y1 ($p < 0,05$). Para a resposta Y2, três efeitos apresentam valores de $p < 0,05$, sendo eles X1, X2 e X3.X3. No que toca a Y3, os efeitos X1 e X1.X1 apresentaram valor $p < 0,05$. O teste de falta de ajuste também é um bom parâmetro estatístico para avaliar a adequação do modelo, através da comparação do erro residual com o erro puro dos pontos do plano replicado. Todos os fatores de resposta apresentam valor de $p > 0,05$ para a falta de ajuste na Tabela ANOVA, o que comprova que o modelo é adequado para os dados observados. Para o modelo quadrático de 2º ordem, a análise de regressão múltipla é demonstrada através do valor do coeficiente de determinação (R^2), ou do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{aj.}$), o qual indica a medida da quantidade de variação em torno da média explicada pelo modelo. Assim, no presente estudo, o modelo explica 83% da variabilidade no fator resposta Y1, 82% em Y2 e 85% em Y3 como pode ser visto pelos valores R^2 . Os dados apresentados acima comprovam que o modelo é adequado para os dados experimentais.

Para cada resposta foi obtido uma equação matemática (Equações 7, 8, e 9), determinadas por análise de regressão múltipla, capaz de demonstrar a dependência das respostas Y1 (pH), Y2 (viscosidade) e Y3 (adesividade) aos fatores de entrada X1 (agente tensioativo), X2 (cera de abelha) e X3 (óleo de macadâmia). Tais Equações encontram-se descritas abaixo.

$$Y1 = 6,91667 + 1,88889 * x1 - 0,1 * x2 - 0,944444 * x2^2 \quad \text{Equação 7}$$

$$Y2 = -6017,55 - 806,2 * x1 + 254,142 * x2 + 1910,56 * x3 - 119,639 * x3^2 \quad \text{Equação 8}$$

$$Y3 = -27,2625 + 134,567 * x1 - 59,105 * x1^2 \quad \text{Equação 9}$$

Tabela XXVI - Resumo do modelo e análise de variância (ANOVA) das variáveis dependentes.

	Soma dos quadrados			Média dos quadrados			Valor-F			Valor-p		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
X1: Agente tensioativo	0,0	1,2999E+06	535,136	0,0	1,2999E+06	535,136	0,0	14,24	11,60	1,0000	0,0195	0,0271
X2:Cera	0,180	1,1626E+06	55,3352	0,18	1,1626E+06	55,3352	7,83	12,74	1,20	0,0489	0,0234	0,3349
X3: Óleo de macadâmia	0,02	427,781	26,3901	0,02	427,781	26,3901	0,87	0,00	0,57	0,4039	0,9487	0,4915
X1.X1	0,252737	765,096	970,21	0,252737	765,096	970,21	10,99	0,01	21,03	0,0295	0,9314	0,0101
X1.X2	0,01	10701,9	20,6116	0,01	10701,9	20,6116	0,43	0,12	0,45	0,5457	0,7493	0,5404
X1.X3	0,0	311,522	158,131	0,0	311,522	158,131	0,000	0,00	3,43	1,0000	0,9562	0,1378
X2.X2	0,0127368	11078,6	76,5096	0,0127368	11078,6	76,5096	0,55	0,12	1,66	0,4981	0,7451	0,2672
X2.X3	0,04	35607,7	2,89	0,04	35607,7	2,89	1,74	0,39	0,06	0,2577	0,5661	0,8147
X3.X3	0,0464211	972755,0	37,9011	0,0464211	972755,0	37,9011	2,02	10,66	0,82	0,2284	0,0309	0,416
Falta de ajuste	0,02	383258,0	124,704	0,00666667	127753,0	41,5681	0,29	1,40	0,90	0,8316	0,3653	0,5147
Erro puro	0,092	365051,0	184,517	0,023	91262,7	46,1292						
Total	0,66	4,23937E+06	2152,85									

R^2 (Y1) = 0,8303; R^2 aj.(Y1) = 0,6121

R^2 (Y2) = 0,8234; R^2 aj.(Y2) = 0,5965

R^2 (Y3) = 0,8563; R^2 aj.(Y3) = 0,6716

Na Figura 44 é apresentado o gráfico de Pareto, no qual se pode observar a representação para os efeitos principais dos fatores de entrada (X1, X2 e X3) e efeitos de interação (X1.X2, X1.X3 e X2.X3) de fatores de entrada por ordem de importância. Com efeito, os fatores de entrada que demonstraram ser estatisticamente significativos ($p < 0,05$), tendo maior interferência na resposta Y1 (pH), são os fatores X1.X1 e X2.

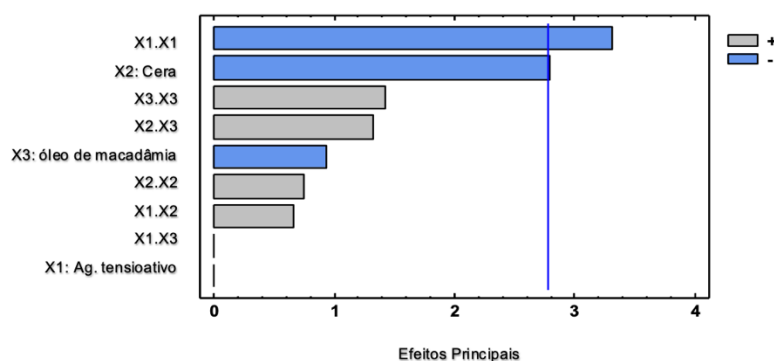


Figura 44– Representação de gráfico de Pareto dos efeitos principais para a resposta Y1.

Na Figura 45 é apresentado o gráfico de efeitos principais, o qual representa graficamente a resposta média para cada nível de fator. Observa-se que o fator X2 e X3 apresentaram efeito negativo para a resposta Y1, demonstrando que quanto maior a concentração de X2 e X3 mais baixo são os valores de pH (Y1). Os efeitos negativos diminuem a resposta quando as definições mudam do valor baixo para o valor alto do fator. Por fim, o fator X1 não apresentou efeitos significativos na resposta Y1, permanecendo com o mesmo valor de pH à medida que a sua concentração aumenta.

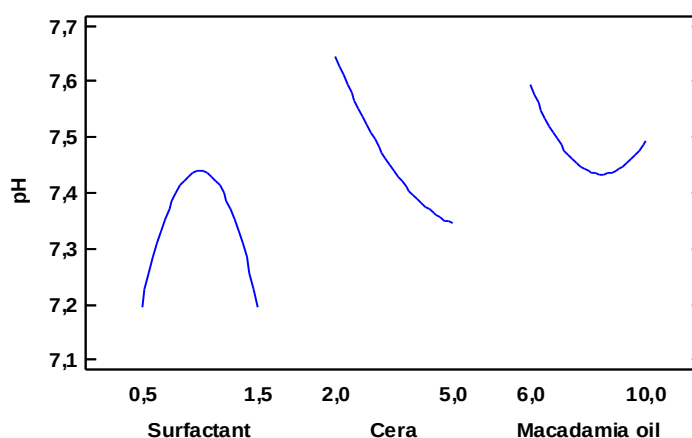


Figura 45- Efeitos dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta Y1.

A 3D surface plot showing the pH of the emulsion as a function of Cera and Macadamia oil concentrations. The vertical axis represents pH, ranging from 7.0 to 8.0. The horizontal axis represents Cera concentration, ranging from 2.5 to 6. The depth axis represents Macadamia oil concentration, ranging from 7 to 10. The surface is colored according to the pH scale, with a legend on the right indicating the color mapping for pH values from 7.0 to 8.0. The surface shows a general trend of increasing pH with increasing Cera concentration, while the effect of Macadamia oil concentration is less pronounced.

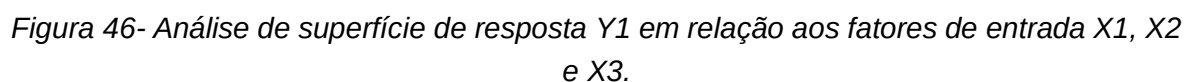


Gráfico de barras horizontais mostrando os efeitos principais das variáveis X1, X2 e X3. O eixo horizontal representa o valor do efeito, variando de 0 a 4. O eixo vertical lista as variáveis e suas interações. As barras cinzas representam efeitos positivos (+) e as barras azuis representam efeitos negativos (-). Uma linha vertical azul indica o nível de significância estatística em aproximadamente 2,7.

Efeito	Valor Aproximado	Sinal
X1: Ag. tensoativo	3,8	-
X2: Cera	3,6	+
X3.X3	3,3	-
X2.X3	0,6	+
X2.X2	0,3	+
X1.X2	0,3	-
X1.X1	0,1	-
X3: óleo de macadâmia	0,1	-
X1.X3	0,1	-



Ao observar o gráfico de efeitos principais na Figura 48, é possível verificar que o fator X1 apresentou um efeito negativo para a resposta Y2, observando-se ainda que a concentração maior de X1 (agente tensioativo) apresentou uma viscosidade mais baixa quando comparado ao valor apresentado na concentração menor. Já o fator X2 apresentou um efeito positivo e significativo na resposta de Y2, sendo que as concentrações maiores de X2 apresentaram valores superiores de viscosidade e o efeito X3 não apresentou efeitos significativos na resposta Y2.

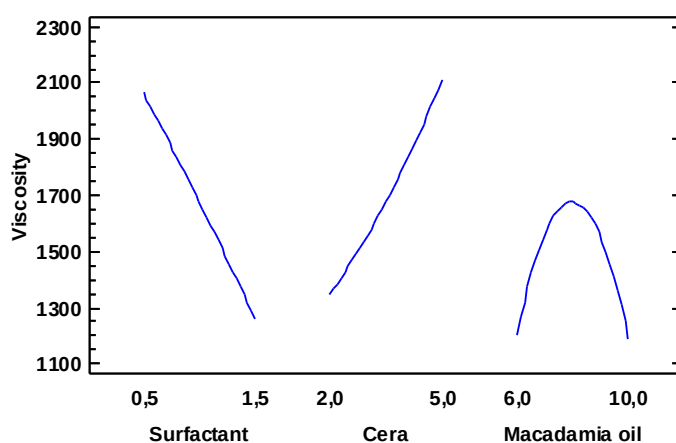


Figura 48 - Efeitos principais dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta Y2.

No gráfico de superfície de resposta para a viscosidade (Y2), representado pela Figura 49, observa-se que a curvatura dos planos aponta uma interação não linear para a viscosidade e dois fatores de entrada (quantidades de cera (X2) e óleo de macadâmia (X3)) quando a quantidade de agente tensioativo (X1) foi fixada em 1,35. É igualmente possível constatar que o aumento da viscosidade ocorre com o aumento da quantidade de X2, o que pode ser explicado pelo fato da cera possuir a função de doador de consistência, levando um aumento da viscosidade da preparação.

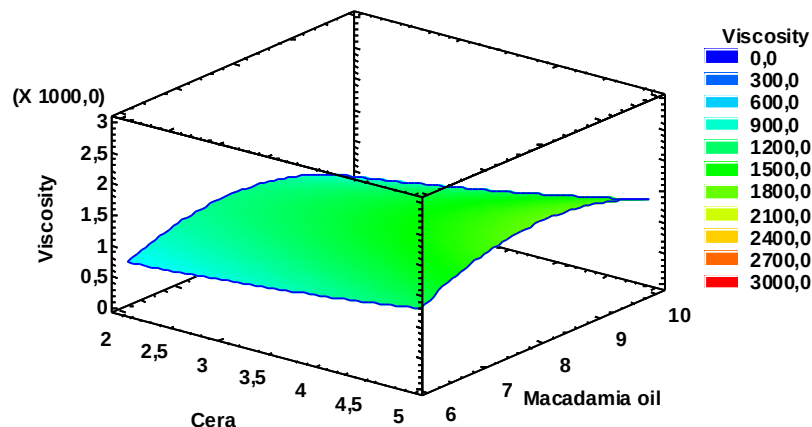


Figura 49- Análise de superfície de resposta para Y2 em relação aos fatores de entrada X1, X2 e X3.

Para a resposta Y3 (adesividade), os fatores X1 e X1.X1 apresentaram interferência significativa na resposta Y3, tal como apresentado na Figura 50.

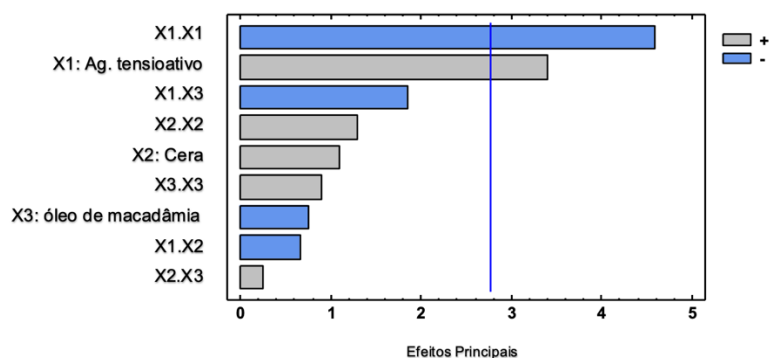


Figura 50- Representação de gráfico de Pareto dos efeitos principais para a resposta Y3.

Na Figura 51, pode observar-se que apenas o fator X3 apresentou um efeito negativo para a resposta Y3.

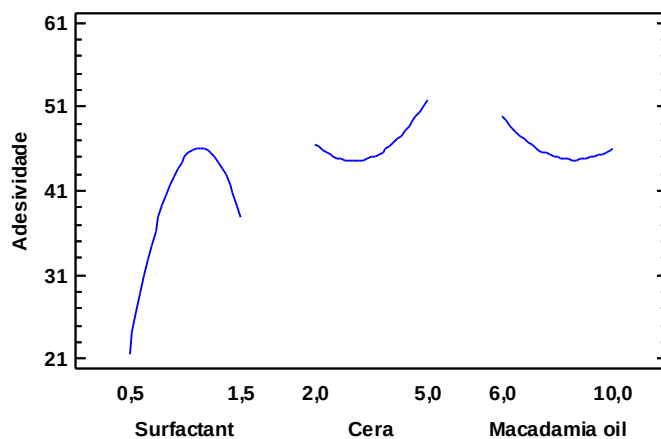


Figura 51 - Efeitos principais dos fatores de entrada X1, X2 e X3 em relação a resposta Y3.

Na Figura 52 é demonstrado que na análise de superfície de resposta para Y3, em relação aos fatores de entrada X2 e X3 (com X1 fixado em 0,8), é possível observar-se um aumento nos valores de adesividade com o aumento dos fatores de X2 e X3. Tal facto é facilmente explicado pelas maiores concentrações de cera branca e óleo de macadâmia. Entretanto, este efeito não foi um efeito significativo.

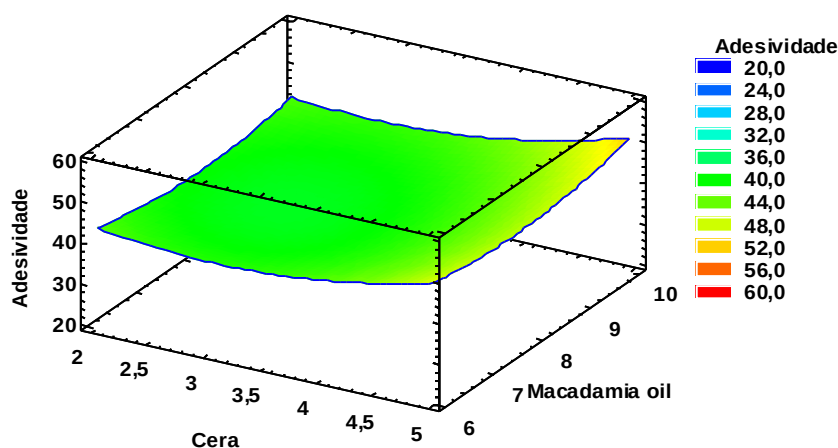


Figura 52- Análise de superfície de resposta para Y3 em relação aos fatores de entrada X1, X2 e X3.

O processo de otimização de múltiplas respostas foi realizado através da combinação dos fatores experimentais com vista a otimizar as três respostas simultaneamente. Assim, as respostas Y1, Y2 e Y3 foram transformadas na escala de desejabilidade, sendo todas maximizadas. Para a função de desejabilidade individual para cada respostas, tanto os valores máximos quanto os mínimos foram tomados como o valor maior e menor das respostas obtidas nas execuções experimentais apresentadas na Tabela XXVI. O valor de

desejabilidade foi calculado com recurso ao programa informático Design Expert e as condições ótimas estão apresentadas no gráfico de desejabilidade (Figura 53).

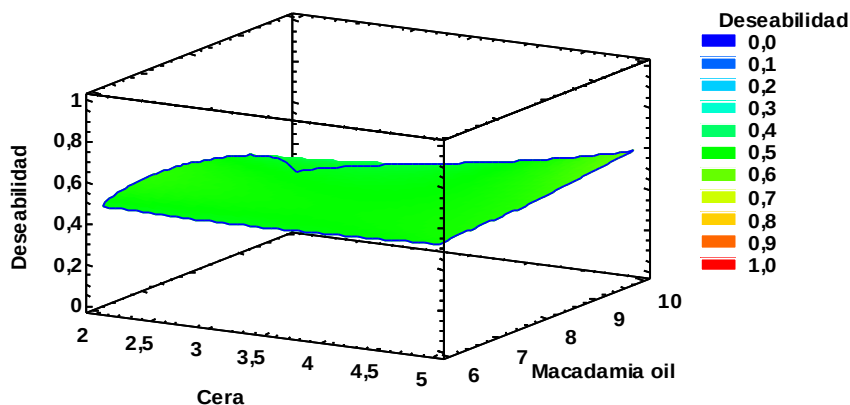


Figura 53- Gráfico de superfície de resposta da combinação de fatores que atinge a desejabilidade.

Os valores ótimos para os fatores foram obtidos em X1: 0,93, X2: 5,00 e X3: 10,00. Para confirmar a adequação do modelo, foram preparados três lotes da formulação otimizada, sendo de seguida avaliadas as três respostas para cada formulação. Os resultados estão apresentados na Tabela XXVII.

Tabela XXVII - Comparação de valores experimentais e observados preparados em condições ótimas.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Valor experimental	7,43 ± 0,09	2214,44 ± 211,74	45,19 ± 2,42
Valor pretendido	7,49	1779,08	53,66
Valor p	0,61	0,27	0,09

4.3 Estudo de estabilidade da formulação otimizada

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do creme ao longo do tempo, foi realizado a preparação da formulação contendo as condições ótimas estabelecida pelo DoE, bem como a formulação com o extrato incorporado. Os ensaios de caracterização foram realizados ao longo do tempo e as amostras armazenadas a temperatura controlada (25 ± 1 °C).

4.3.1 Análise organolética

Na Tabela XXVIII estão descritas as características organoléticas da formulação com as condições ótima, bem como da formulação com o extrato incorporado. A formulação foi avaliada 3 horas após a preparação e 2 dias após a preparação. Os cremes apresentaram aspeto homogêneo, sem separação de fases, tendo a consistência sido a adequada. O creme da formulação otimizada apresentou coloração branca e ausência de odor, enquanto o creme com extrato apresentou tonalidade de castanho claro e odor frutado semelhante ao caramelo. Com efeito, é possível concluir que a formulação base apresentou resultados satisfatórios, atendendo aos requisitos previamente estabelecido pelo QTPP.

Tabela XXVIII - Descrição das características organoléticas das preparações.

Creme	Registo fotográfico	Cor	Aspeto	Odor
Formulação otimizada		Branco	Homogêneo	Inodoro
Formulação otimizada com extrato		Castanho claro	Homogêneo	Frutado

4.3.2 Análise do pH ao longo do tempo

Na Figura 54 é possível observar que a formulação ótima apresentou valores de pH entre 7,2 e 7,8, não se verificando ao longo do tempo alterações significativas nos valores do pH da formulação. A incorporação do extrato na formulação ótima originou uma ligeira redução do pH, apresentando valores compreendidos entre 4,8 e 4,9, sem alterações ao longo do tempo.

Após a análise dos resultados, é possível concluir que não há variações significativas do pH ao longo do tempo, sendo estes valores compatíveis com o pH da pele. Além disso, o resultado obtido apresentou valores satisfatórios para o produto objeto de estudo.

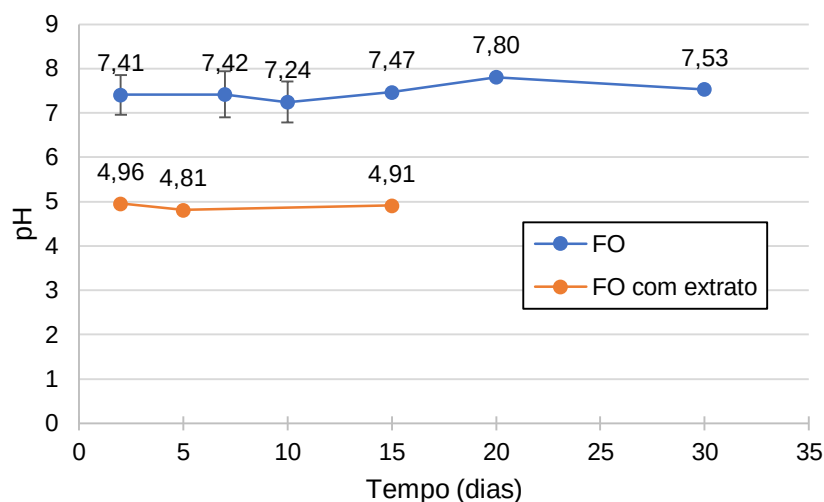


Figura 54- Análise do pH da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

4.3.3 Análise da textura ao longo do tempo

O resultado da análise da textura está apresentado nas Figuras 55, 56 e 57, sendo possível observar-se um aumento dos valores até um determinado período de tempo, o qual pode estar relacionado com a estrutura de amadurecimento da formulação. Observa-se ainda que a incorporação do extrato origina uma interferência na consistência do produto, que, no entanto, permanece estável no tempo avaliado.

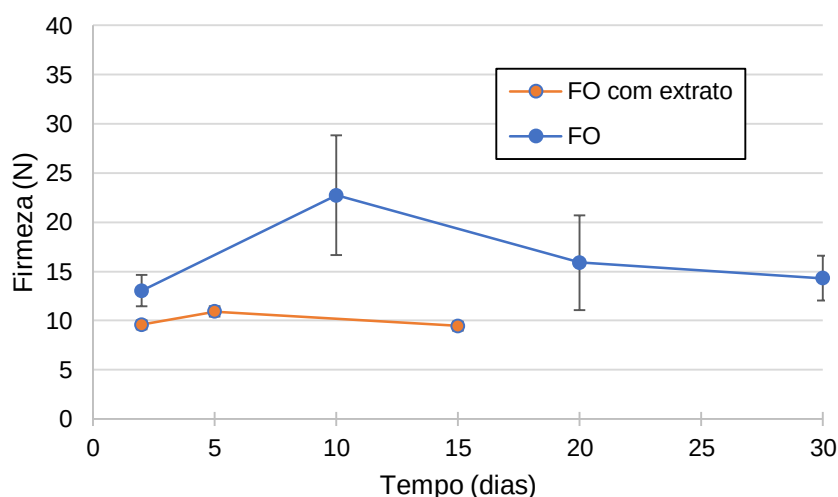


Figura 55- Resultado da firmeza da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

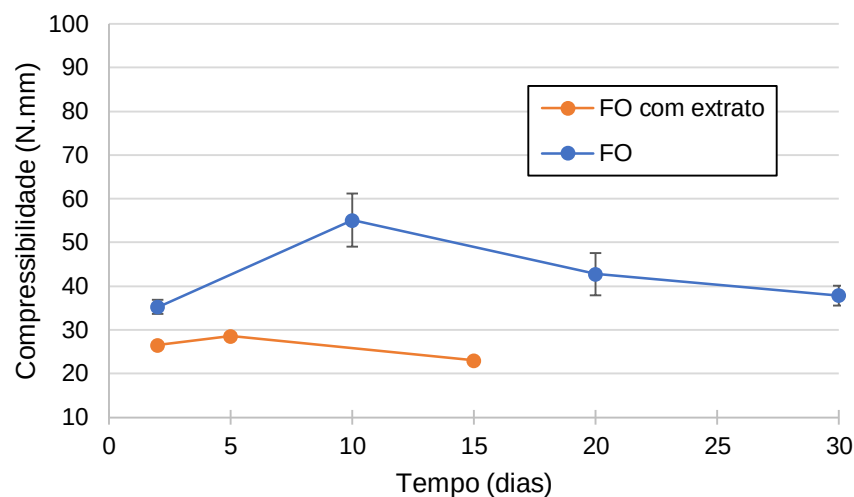


Figura 56- Resultado da compressibilidade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

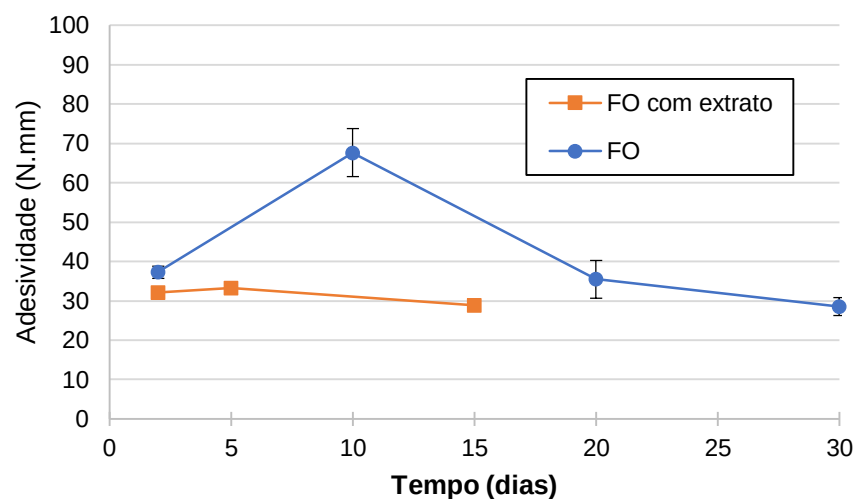


Figura 57- Resultado da adesividade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

4.3.4 Análise do diâmetro da fase interna ao longo do tempo

Na Figura 58 encontram-se resumidos os resultados da avaliação do diâmetro da fase interna avaliadas ao longo do tempo. Após análise, verificou-se que, com relação ao DV90, não ocorreram variações no diâmetro com a incorporação do extrato, no entanto, para o DV50 e o DV10 ocorre um aumento no diâmetro com a incorporação do extrato. A maior parte das gotículas (90%) apresentaram tamanhos na escala micrométrica (μm), inferiores a 80 μm e pode-se observar também que ao longo do tempo o diâmetro da fase interna permanece estável para ambas as formulações.

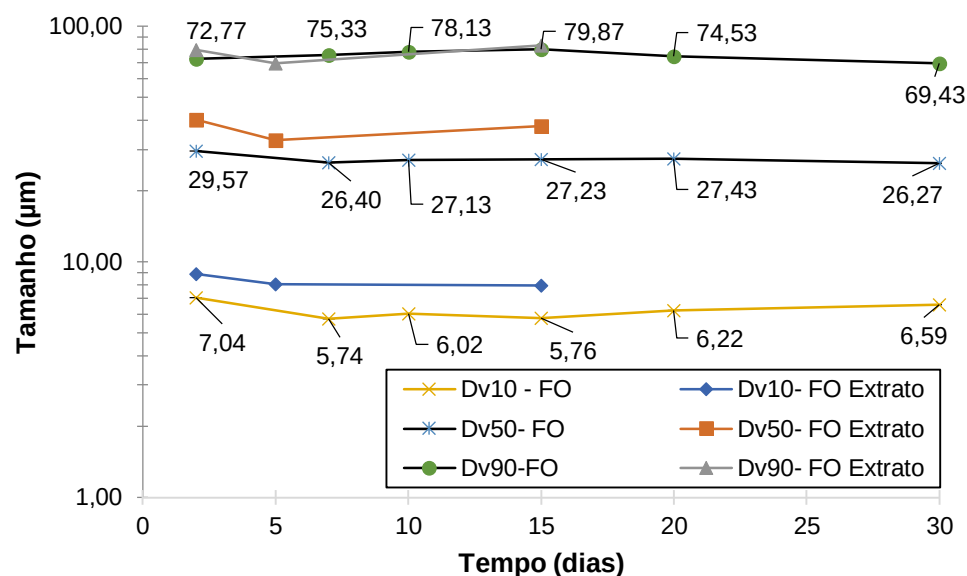


Figura 58- Resultados do diâmetro da fase interna da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

4.3.5 Análise colorimétrica ao longo do tempo

Os resultados da análise colorimétrica da formulação otimizada e da formulação com extrato podem ser vistas nas Figuras 59 e 60. Após análise da Figura 59, é possível concluir que tanto a formulação otimizada como a formulação com o extrato apresentam elevada luminosidade (parâmetro L^*), sem alterações significativas, o que comprova a estabilidade ao longo do tempo.

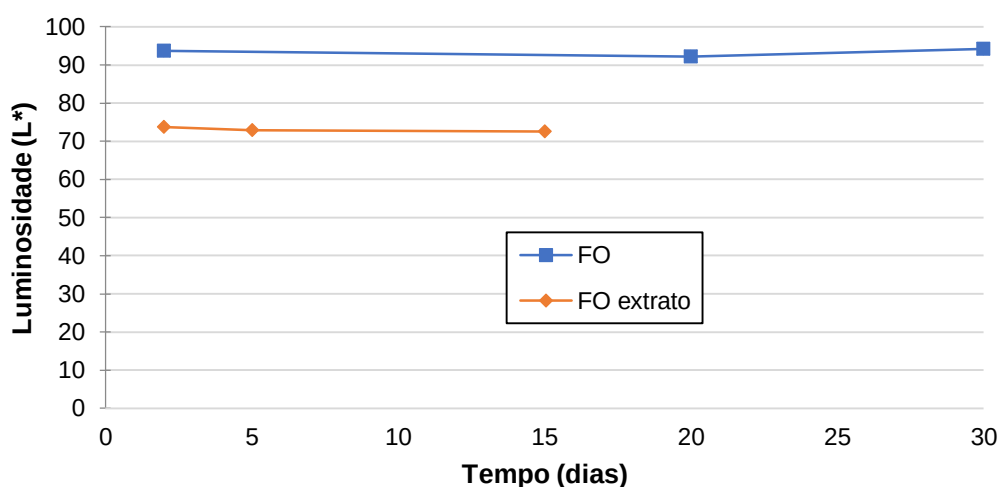


Figura 59- Luminosidade (L^*) ao longo do tempo.

No que toca às coordenadas a^* e b^* (Figura 60), observa-se que não ocorreram alterações ao longo do tempo na formulação otimizada. Entretanto, a formulação com extrato apresentou um ligeiro aumento desses parâmetros, comprovando que as cores presentes no creme com extrato se intensificam ao longo do tempo, tendo a coordenada a^* resultado positivo (+a) correspondentes à coloração vermelha e a coordenada b^* resultado positivo indicando coloração no intervalo do amarelo (+ b^*).

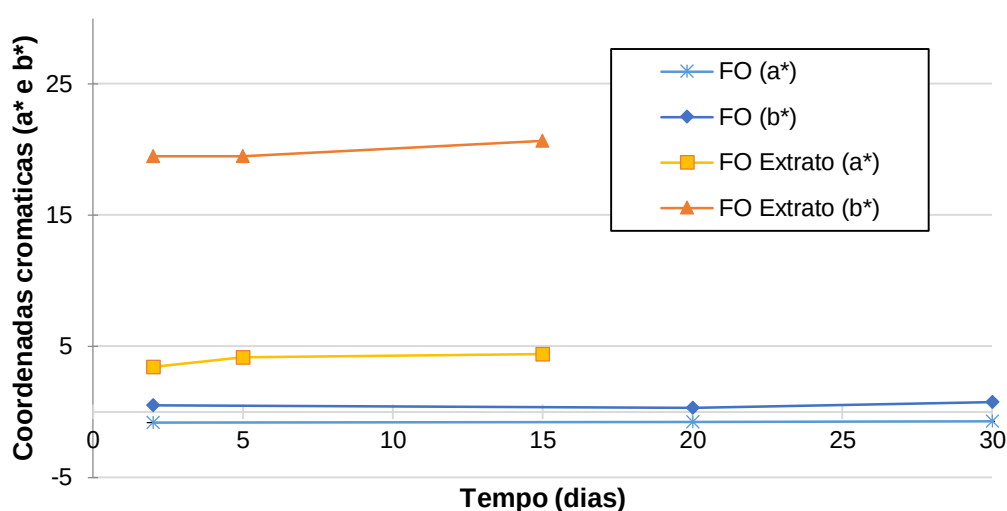


Figura 60- Coordenadas cromáticas (a^* e b^*) ao longo do tempo.

4.3.6 Ensaios reológicos

4.3.6.1 Viscosidade ao longo do tempo

A Figura 61 representa a variação da viscosidade da formulação otimizada e da formulação com extrato avaliadas ao longo do tempo, sendo possível observar que a viscosidade se mantém estável durante o período testado. Com a incorporação do extrato na formulação otimizada, verifica-se uma pequena redução na viscosidade, não sendo, contudo, significativa.

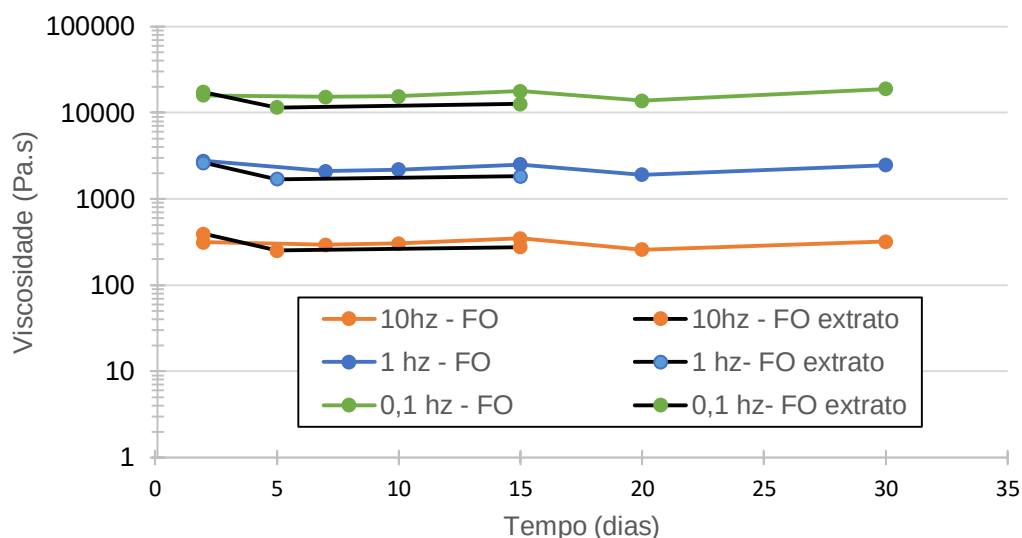


Figura 61- Resultados da viscosidade da formulação otimizada e da formulação com extrato ao longo do tempo.

Diante do resultado exposto, pode-se concluir que não ocorreram alterações significativas no comportamento reológico dos cremes, mantendo-se a formulação estável ao longo do tempo.

4.3.6.2 Tensão de cedência da formulação com extrato

O resultado do ensaio de tensão de cedência realizado na formulação otimizada com o extrato, 2 dias após preparação e armazenada a temperatura controlada (25 ± 1 °C) foi de 82,79 Pa. Este valor foi muito superior ao que foi obtido para o creme obtido na fase preliminar do estudo, que foi de 54,21 Pa, dando a ideia que este creme otimizado se apresentava mais consistente em repouso sendo necessário exercer uma maior tensão para que ele escoasse.

4.3.6.3 Análise do grau de tixotropia da formulação com extrato

O teste de grau de tixotropia foi realizado 2 dias após a preparação armazenadas a temperatura controlada (25 ± 1 °C). Na Figura 62 constata-se que o creme com o extrato incorporado apresentou comportamento tixotrópico, sendo possível observar que ocorre uma diminuição acentuada da viscosidade, demonstrando que a recomposição da estrutura ocorre de forma mais lenta do que a destruição inicial.

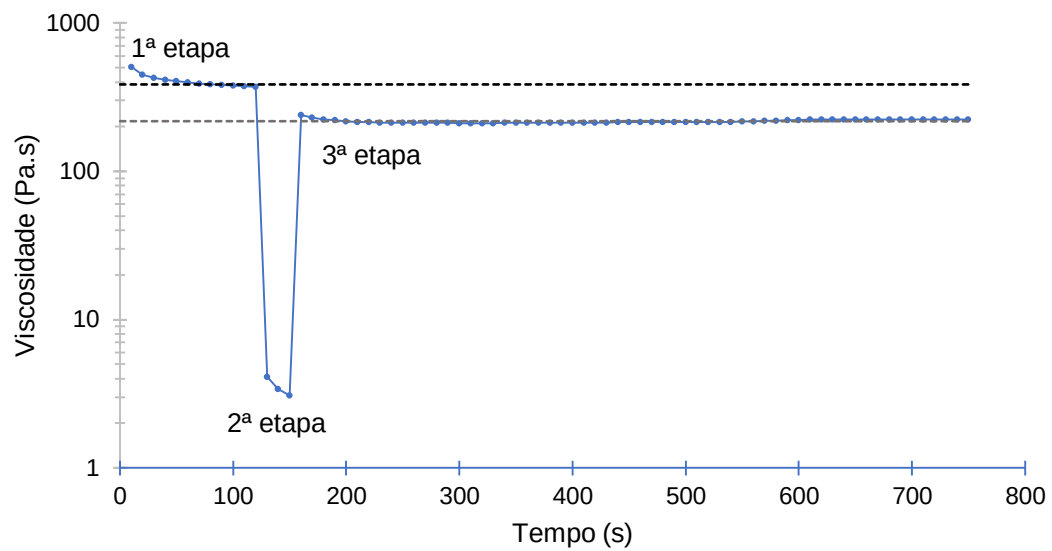


Figura 62- Gráfico da análise do grau de tixotropia da formulação otimizada com extrato.

5 Conclusões

O extrato de cascas de *C. sativa* apresenta propriedades antioxidantes devido à presença de compostos fenólicos, de modo particular ácidos fenólicos e taninos (condensados e hidrolisáveis), os quais atuam na prevenção do envelhecimento cutâneo, além de apresentarem atividade anti-inflamatória e promoverem a hidratação da pele e a proteção do colagénio. Com efeito, face às propriedades apresentadas a incorporação deste extrato numa formulação cutânea é uma excelente opção para valorizar este subproduto e estimular a economia circular.

A garantia da qualidade e desempenho de produtos semissólidos tópicos requer que o desenvolvimento do produto e do processo sejam bem estruturados. A aplicação da abordagem QbD nesta etapa pode promover a qualidade desejada do produto final. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação tópica semissólida com extrato de cascas de *C. sativa* seguindo o conceito "*Quality by design*". O objetivo foi alcançado com sucesso, tendo sido possível construir um produto com qualidade levando em consideração as vulnerabilidades de todo o processo através de ferramentas de análise de risco e ferramentas de DoE. Para isso, recorreu-se à otimização através da análise de superfície de resposta utilizando o modelo Box-Behnken com três fatores a três níveis, construindo modelos polinomiais de segundo grau. As variáveis independentes estudadas foram a quantidade de laurilsulfato de sódio (%) (X1), de cera branca (%) (X2) e de óleo de macadâmia (%) (X3); as variáveis dependentes foram o pH (Y1), a viscosidade (Y2) e a tensão de cedência (Y3). De acordo com o modelo matemático, a formulação ótima é a que apresenta laurilsulfato de sódio, cera branca e óleo de macadâmia nas respetivas percentagens de 0,93, 5,00 e 10,00. Após validação da formulação ótima, procedeu-se ao desenvolvimento da formulação otimizada e da formulação otimizada com extrato, as quais foram armazenadas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e caracterizadas ao longo do tempo no que toca às características organoléticas e tecnológicas. Foi possível constatar que os resultados foram satisfatórios, sendo a formulação estável, cumprindo os requisitos delineados no QTPP do produto.

Com efeito, o presente trabalho permitiu demonstrar a aplicabilidade e relevância do uso da abordagem QbD nos estágios iniciais do desenvolvimento de produtos semissólidos tópicos, auxiliando na compreensão da formulação e do processo de fabrico, reduzindo a variabilidade do produto e obtendo a qualidade desejada do produto final. Como perspetiva futura, e visando uma comercialização do produto obtido, dever-se-ão efetuar ensaios de segurança e eficácia para o produto obtido, seguindo as normativas regulamentares vigentes, bem como alargar o estudo da estabilidade.

6 Referências bibliográficas

1. INE. Estatísticas Agrícolas 2018. In: Instituto Nacional de Estatística IP, Ed. 2019, editor. Lisbon, 2019.
2. Díaz RB, Couto D, Moure A, Fernandes E, Domínguez H, Parajó JC. Optimization of antioxidants: Extraction from *Castanea sativa* leaves. Chem Eng J 2012; 203(0):101-9.
3. European Commission. The European Commission's science and knowledge service. Sweet Chestnut, *Castanea sativa* Mill. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/forestry/gr-tree-project/sweet-chestnut> [acedido em 06/05/2020].
4. Pinto D, Braga N, Silva AM, Delereu-Matos C, Rodrigues F. Valorization of fruit processing by-products. Wood Pub; 2019.
5. Rodrigues F, Santos J, Pimentel FB, Braga N, Palmeira-de-Oliveira A, Oliveira MBPP. Promising new applications of *Castanea sativa* shell: Nutritional composition, antioxidant activity, amino acids and vitamin E profile. Food & Func 2015; 6 (8):2854-60.
6. Cruz BR, Abraão AS, Lemos AM, Nunes FM. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). Carbohydr Polym 2013; 94 (1): 594-602.
7. Braga N, Rodrigues F, Oliveira MBPP,. *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application. Nat Prod Res 2015; 29 (1): 1-18.
8. De Vasconcelos MD, Bennett RN, Rosa EAS, Cardoso JVF. Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation. J Agric Food Chem 2007; 55 (9):3508-16.
9. De Vasconcelos MD, Bennett RN, Rosa EAS, Cardoso JVF. Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 1. Starch, fat, energy and fibre. Int Jour of Food Sci and Tec 2010; 44: 2606–2612.
10. Gonçalves B, Borges O, Costa HS, Bennett R, Santos M, Silva AP. Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. Food Chem 2010; 122 (1): 154-60.
11. Gold MA, Cernusca MM, Godsey L. Chestnut market analysis: Producers' perspective. Univ. of Miss Center for Agrof Columbia, Missouri, 2005 Jun; p.34.
12. Barreira JC, Casal S, Ferreira IC, Peres AM, Pereira JA, Oliveira MB. Chemical characterization of chestnut cultivars from three consecutive years: chemometrics and contribution for authentication. Food Chem Tox 2012; 50 (7): 2311-7.
13. Sabaté J, Radak T, Brown JJr. The role of nuts in cardiovascular disease prevention. In R. Wildman (Ed.), Handbook of nutraceuticals and functional foods; 2000; P. 261–267.
14. Pazianas M, Butcher GP, Subhani, JM, Finch PJ, Ang L, Collins C. Calcium absorption and bone mineral density in celiacs after long term treatment with gluten-free diet and adequate calcium intake. Osteoporosis International 2005; 16: 56–63.
15. Barreira J, Ferreira I, Oliveira M, Pereira J. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chem 2008; 107: 1106–1113.
16. Squillaci G, Apone F, Sena, LM, Carola A, Tito A, Bimonte M. Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) industrial wastes as a valued bioresource for the production of active ingredients. Proc Bioch, 2018; 64: 228-236.
17. Carocho M, Calhella RC, Queiroz M-JRP, Bento A, Morales P, Soković M, Ferreira ICFR. Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. Ind Crop Prod, 2014; 62(0):42-6.
18. Neves JM, Matos C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal) J Ethnoph, 2009; 270-283.

19. Blaiotta G, La Gatta B, Di Capua M, Di Luccia A, Coppola R, Aponte M. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. *Food Microbiol* 2013; 36(2):161-9.
20. Mujic´A, Grdovic´N, Mujic´I, Mihailovic´M, Živkovic´J, Poznanovic´G, Vidakovic´M. Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic β -cells. *Food Chem* 2011; 125: 841–849.
21. Vázquez G, González-Alvarez J, Santos J, Freire MS, Antorrena G. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Ind Crops Prod*, 2009; 29 (2-3), 364-370.
22. Plubee [homepage na internet]. Plantar Castanheiros – como plantar rentabilizar a cultura? Disponível em: <http://www.plubee.com/plantar-castanheiros/>. [acedido em 06/05/2020].
23. Museu Virtual de Manteigas [homepage na internet]. Castanheiro (*Castanea Sativa* Mill.). Disponível em: <http://museuvirtual.activamanteigas.com/index.php/places/arvores/castanheiro-castanea-sativa-mill/> [acedido em 06/05/2020].
24. LÜ J, LIN PH, YAO Q, CHEN C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14 (4): p. 840-860.
25. Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metallloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; (2) 191–206.
26. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB* 1997; 43 (1): 61-8.
27. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev de Nut*, Campinas 2010; 23 (4); p. 629-643.
28. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142 (2): 231.
29. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004; 53 (1): 110-8.
30. Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antim Ag Chem* 1997; 41(5): 992-8.
31. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195 (3): 298-308.
32. Ayala F, Palla M, Di Trollo R, Mozzillo N, Ascierto PA. The role of optical radiations in skin cancer. *ISRN Dermatology* 2013.
33. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allerg* 2005; 4 (4): 517-9.
34. Khlebnikov AL, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. B Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* 2007; 15:1749-1770.
35. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-1150.
36. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042
37. Khalid R. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin Interv in Ag* 2007; 2: 219-36.
38. Brand-williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Techn* 1995; 28: 25-30.
39. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.

40. Hernández AM, Prieto gonzáles EA. Plantas que contienen polifenoles. Rev Cub de Investig Biom 1999; 18 (1): 12-14.
41. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonóids and isoflavonoids. Pharmac Therap 2001; 90: 157-177.
42. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. Nutrition 2002; 18 (1): p. 75-81.
43. Marchand LL. Cancer preventive effects of flavonóids – a review. Biomed Pharmac 2002; 56: 296-301.
44. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr 2001; 21: 381-406.
45. Santi MD, Zunini MP, Vera B, Bouzidi C, Dumontet V, Abin-Carrriquiry A, Grougnet R, Ortega MG. Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) *in vitro* and molecular docking studies. Europ jour of med chem 2018; 143: 577-582.
46. Heim EK, Tagliaferro RA, Bobilya JD. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J of Nut Bioch 2002; 13 (1): 572-584.
47. Miller AL. Antioxidant flavonoids: Structure, function and clinical usage. Alter Med Rev 1996; 103-111.
48. Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian J Pharm Sci 2018 Jan; 13 (1): 12-23.
49. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. Microcirculation, 2000; 7 (6 Pt 2): 29-34.
50. Gonçalves RMF. Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais: Efeito antinutricional de bebidas comuns. Tese de mestrado. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Escola de Engenharia da Universidade do Minho; 2007.
51. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. Quim Nova 2006; 29 (4): 755-760.
52. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev Nutr 2002; 15: 71-78.
53. Oliveira DM, Bastos DHM. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. Quim Nova 2011; 34 (6): 1051-1056.
54. Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitiz, MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciênc Agrár 2010; 31 (3) 669-682.
55. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti- inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch Dermatol Res. 2010; 302(2): 71-83.
56. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. Int J Dermatol. 2004; 43(5):326-35.
57. Rios JL, Bas E, Recio MC. Effects of Natural Products on Contact Dermatitis. Curr Med Chem Anti Inflamm Anti Aller Ag 2005; 4 (1):65-80.
58. Beg S, Rahman M, Kohli K. Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products. Drug discov tod 2019 Mar, 24 (3): 717-725.
59. Aksu B, De Beer T, Folestad S, Ketolainen J, Lindén H, Lopes JA, et al. Strategic funding priorities in the pharmaceutical sciences allied to Quality by Design (QbD) and Process Analytical Technology (PAT). Eur J Pharm Sci. Elsev B.V.; 2012 Sep; 29; 47 (2): 402–5.
60. Juran J M, Juran On Quality By Design: The New Steps For Planning Quality Into Goods And Services. New York: The Free Press; 1992.
61. ICH. ICH Harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical Development Q8(R2). 2009. Disponível em

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf [acedido em 04/05/2020].

62. Lolas GA, Rathore SA. Regulatory Challenges in the QbD Paradigm. *Biopharm intern.* 2012 sept; 25 (9) 44-53.
63. Yu L, Amidon G, Khan M, Hoag S, Polli J, Raju G, Woodcock J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J* 2014; 16 (4): 771-783.
64. Lourenço V, Lochmann D, Reich G, Menezes JC, Herdling T, Schewitz J. A quality by design study applied to an industrial pharmaceutical fluid bed granulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 81(2): 438- 447.
65. Raw AS, Lionberger R, Yu LX. Pharmaceutical equivalence by design for generic drugs: modified-release products. *Pharm Res* 2011; 28: 1445–53.
66. ICH Q-IWG - Points to Consider (R2), ICH-Endorsed Guide for ICH Q8/Q9/Q10 Implementation. (Dec. 6, 2011). Available on Internet: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_9_10/QAs/PtC/Quality_IWG_PtCR2_6dec2011.pdf [acedido em 04/05/2020].
67. McConnell J, Nunnally B, McGarvey B. Quality risk management and variability reduction. *J of Valid Techn* 2011; 12-6.
68. ICH. ICH Harmonised tripartite guideline: Quality Risk Management Q9. 2005. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf [acedido em 04/05/2020].
69. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments, 5th Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc 2004; ISBN: 0471316490.
70. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* 2008; 76 (5): 965-977.
71. FDA. Guidance for Industry: Q8, Q9, & Q10 Questions and Answers: Appendix Q&As from Training Sessions. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM313094.pdf>. 2012 [acedido em 06/05/2020].
72. Fukuda MI, Pinto FFC, Moreira SC, Saviano MA, Lourenço RF. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Braz J of Pharm Sci* 2018; 54.
73. Mitchell M. Determining Criticality—Process Parameters and Quality Attributes Part II: Design of Experiments and Data-Driven Criticality. *Biop Intern* 2014, 27: 34-40.
74. Candiotti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta.* 2014; 124: 123-138.
75. Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Develop Ind Pharm* 2017; 43 (6): 889-901.
76. Box GE, Behnken DW. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Techn* 1960; 2 (4): 455-475.
77. Souza Anderson S, dos Santos Walter NL, Ferreira Sérgio LC. Application of Box–Behnken design in the optimization of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spect Acta Part B* 2005; 609: 737–42.
78. Aslan N, Cebeci Y. Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel* 2007; 86: 90–97.
79. Ferreira SLC, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, Silva EGP, Portugal LA, Reis OS, Souza AS, Santos WNL. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta* 2007 Aug; 597 (2): 179-186.

80. Gunaraj V, Murugan N. Application of response surface methodol- ogies for predicting weld base quality in submerged arc welding of pipes. J Mater Process Technol 1999; 88:266–75.
81. Bezerra MP, Rodrigues LNC. Quality by Design (QbD) como ferramenta para otimização dos processos farmacêuticos. Inf 2017; 29: 5-12.
82. FDA. Guidance for Industry: Q8, Q9, & Q10 Questions and Answers: Appendix Q&As from Training Sessions. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM313094.pdf>. 2012 [acedido em 23/05/2020].
83. ICH Q-IWG - Enhanced Training Elements: Key Messages, Implementation of ICH Q8, Q9, Q10 Disponível em: https://admin.ich.org/sites/default/files/inline-files/Q-IWG_Web_Key_Messages.pdf. 2010. [acedido em 23/05/2020].
84. Aponte O, Díaz B, Huertas C.; La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. Estud gerenc 2014; 31: 68-78.
85. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Ghosh P, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. Ther Deliv 2010; 1(1): 109.
86. FDA. Generally Recognized as Safe. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. [acedido em: 02/05/2020].
87. CIR. Cosmetic Ingredient Review. Disponível em: <https://www.cir-safety.org/>. [acedido em: 02/05/2020].
88. Isaac VLB, Chiari BG, Magnani C, Corrêa MA. Análise sensorial como fer- ramenta útil no desenvolvimento de cosméticos. Rev ciênc farm básica apl 2012; 33(4): 479-488.
89. Prista, L.V.N., Tecnologia Farmacêutica 8º ed. Vol II, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2009.
90. Farmacopeia Portuguesa, 1º vol- Lisboa: Infarmed – Ministério da Saúde; 2008.
91. Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, Maibach H, Marques M, Rytting H, Shaw S, Thakker K, Yacobi A. Topical and Transdermal Drug Products. The Unit St Pharm Conv, 2009 May-June, 35: 750–764.
92. Barnes, HA, An introduction to rheology. Primeira edição, ESP BV, The Netherlands; 1989.
93. Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. J of Cont Rel 2009; 136 (2): 88-98.
94. Sheth BB. Viscosity measurements and interpretation of viscosity data. J of Text St 1976; 7(2): 157 -178.
95. Malvern Panalytical. A Basic introduction to rheology. Disponível em: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/pt/produtos-solucoes/reologia/> [acedido em 30/03/2020].
96. ISO 5492 (2008). Sensory analysis- Vocabulary International Standard.
97. Konica Minolta. Entendendo o espaço de cor L*a*b*. Disponível em: <http://sensing.konicaminolta.com.br/2013/11/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>. [acedido em 11/04/2020].
98. Guiandalini C, Oliveira MM. Qualidade por concepção: uma nova abordagem para acelerar o desenvolvimento tecnológico e inovação na área da saúde. Vigil sanit debate 2017; 5 (1): 3-10.
99. Moradi MR, Farsangi MAE. Application of the Risk Matrix Method for Geotechnical Risk Analysis and Prediction of the Advance Rate in Rock TBM Tunneling. Rock Mec and Rock Eng 2014; 47: 1951–1960.
100. Wall KD. The trouble with risk matrices. Naval Postgraduate School (DRMI); 2011.